



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107920484 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680049186.7

(72)发明人 T·克朗

(22)申请日 2016.06.24

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(30)优先权数据

62/184,596 2015.06.25 US

62/269,514 2015.12.18 US

62/269,496 2015.12.18 US

62/269,531 2015.12.18 US

代理人 付文川 吴小瑛

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/039339 2016.06.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/210315 EN 2016.12.29

(71)申请人 艾乐速AG技术有限公司

地址 美国爱荷华州

权利要求书2页 说明书20页 附图2页

(54)发明名称

种子生产

粉开始每天脱落之前几个连续早晨,将花粉有意应用于雌性。

(57)摘要

本发明描述了在任何作物植物中制备杂交种子、同时也减少来自异系杂交和自花授粉的污染的新方法。不同于常规种子生产方法,本发明的方法不依赖于任何形式的雄性不育在雌性亲本植物中的应用,也不依赖于与相同物种的无关的和不希望的植物的隔离距离的应用,也不依赖于临近靶雌性的雄性亲本植物的应用。所述方法包括在需要时递送雄性亲本的花粉,所述花粉可在保存的花粉库中得到,或在它们变得可得到时从雄性植物实时收集。当来自雌性和位置上靠近的无关植物的有活力的花粉没有被释放时,将期望的花粉递送至能育的雌性。递送的雄性花粉具有这样的量和偶然定时:它优先给所述雌性授粉,并在与使用当前杂交生产实践且不利利用雄性不育实践或所述隔离距离的方法相比高许多的水平产生相对纯的杂交种子。这样的偶然定时可能包括,在雌性亲本花粉变得有活力之前一天或两天,和/或在雌性亲本花粉或其它附近植物花

1. 一种种子生产方法,其中通过减少污染来提高得到的种子的遗传纯度,所述方法包括:

- a. 培养包括雌性和雄性组分的指定雌性亲本植物;
- b. 当所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分不释放有活力的花粉时且当其它生物学上相容的花粉来源也不释放有活力的花粉时,在一个或多个时机用指定雄性植物花粉对所述指定雌性亲本植物有意授粉;
- c. 使所述指定雌性植物生长至成熟;和
- d. 收获由所述指定雌性植物产生的种子。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括减少或消除对一种或多种以下条件的需要:

- i. 所述指定雌性植物的雄性不育;
- ii. 所述指定雌性植物与任何生物学上相容的花粉来源的物理和/或时间分离;和
- iii. 要在所述指定雌性植物附近生长的雄性授粉植物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉包含以下一项或多项:

- a. 新鲜花粉
- b. 保存的花粉。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雌性亲本植物是以下的任意一种或多种:玉米植物、大豆植物、小麦植物、稻植物、向日葵植物、芸苔植物、高粱植物、棉树、大麦植物、珍珠粟植物或苜蓿植物。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉的有意应用通过以下任意一种或多种进行:机械装置、气动装置、正压装置、负压装置、手动装置或它们的组合。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉的有意应用通过自动化或半自动化装置进行。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述自动化或半自动化装置是车辆或无人驾驶飞机。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉是已经从以下一种或多种收获的新鲜花粉:田地、生长室、温室、玻璃房、遮蔽房、拱形温室、垂直农业设备或无土栽培设备。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉是保存的花粉,其之前已经通过冷藏、冷却、深低温保藏、冷冻、冷冻干燥或在液氮中贮存而收集和保存。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述指定雄性植物花粉已经从以下一项或多项收集:

- i. 具有改变的昼夜节律的来源;和
- ii. 具有正常昼夜节律开花的来源,但是其中所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分被延迟;和
- iii. 具有正常昼夜节律开花的来源,其中允许所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分没有延迟地脱落。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中在超过一个时机将所述指定雄性植物花粉应用于相同的指定雌性亲本植物。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中在指定雌性亲本植物首次变成可接受所述花粉时应用所述指定雄性植物花粉。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分的成熟用处理进行延迟。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述指定雄性植物花粉得自单一遗传学来源。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述指定雄性植物花粉得自多个遗传学来源且应用之前组合。

种子生产

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月25日提交且标题为SEED PRODUCTION(种子生产)的美国临时申请系列号62/184,596、和2015年12月18日提交且标题为SEED PRODUCTION(种子生产)的美国临时申请系列号62/269,496、和2015年12月18日提交且标题为GRAIN PRODUCTION(谷物生产)的美国临时申请系列号62/269,531、和2015年12月18日提交且标题为GRAIN PRODUCTION(谷物生产)的美国临时申请系列号62/269,514的优先权。美国临时申请系列号62/184,596、62/269,496、62/269,531和62/269,514的内容特此通过引用以它们整体并入。

技术领域

[0003] 本发明一般地涉及新颖的、响应需要的种子和/或杂交种子生产技术(在下文中被称作“杂交种子”)。更具体地,本发明涉及不依赖于活跃花粉脱落、雄性不育和/或物理分离的杂交种子生产技术。

背景技术

[0004] 本发明应用于杂交作物种子生产和植物育种实践的领域,包括、但不限于,玉米(也称为玉蜀黍)、大豆、小麦、稻、向日葵、芸苔、高粱、棉花、大麦、珍珠粟、苜蓿和其它植物。基于植物中生殖器官的位置和能育性的定时,许多物种依赖于自花授粉以便产生能育种子。在不执行某种形式的机械、物理或遗传干涉以提供植物雄性不育的情况下,许多植物简单地复制它们的亲本植物的遗传学。杂交植物是一种遗传背景的雄性花粉来源与具有不同遗传背景的植物的雌性生殖器官的杂交引起的受精的结果。在作物植物之间的杂交性通常提供在商业生产中的收率优点,且因此是生产商业作物的开放或自花授粉方法所优选的(如果可能的话)。如在图1中所示,作物收率随着杂交在二十世纪四十年代的广泛引入开始显著地增加,且作物收率随着时间继续稳定地增加直到现在。目前,玉米、稻、高粱、向日葵和芸苔是利用杂交种子的主要作物。由于克服生殖器官结构的生物学带来的阻碍所需的资源的量和有效雄性不育方法的不可用性,在其它作物(诸如大豆和小麦)中的杂交种子生产规模是非常有限的。从通常自花授粉的植物品种生产杂交种子的大规模方法是缺乏的或无效率的,但是如果可行的话将具有巨大价值。广泛已知,种植和培养杂交种子会提供与种植和培养自花授粉的或变种的种子相比大得多的种子收率潜力。

[0005] 鉴别出新的杂交种子品种以后不久,农夫通常急切地在他们的田地中利用种子。因此,需要种子生产。目前,大多数种子是单杂交杂种而不是双杂交杂种,后者在二十世纪早期经常使用。但是,可以使用任一种。向单杂交杂种的转换是由于这样的种子的增加的收率。生产农夫在每个季节需要的所有种子需要大量土地。为了有效地生产期望的杂种,授粉必须由适当的亲本进行,这要求对花粉来源的严格控制。这经常需要阻止指定雌性植物的花粉给自身授粉,或自花授粉。通常,这通过诱导雄性不育来实现。例如,在玉米中,经常将雌性亲本去雄花穗。但是,去雄花穗具有缺点。首先,它是昂贵的。其次,植物受到损伤,这会

导致更低的收率。为了解决去雄花穗的缺点,已经提出了其它形式的雄性不育。例子包括细胞质雄性不育、遗传因子雄性不育和化学诱导的雄性不育。所有这些都具有缺点。

[0006] 因此,对于其中杂交生产是常事的作物,当前的生产杂交种子的方法随物种变化,但是通常包含下述组分:(1)在排列成彼此紧密靠近的生产地块中种植雌性和雄性亲本植物;(2)将所述生产地块定位在一个分离的位置以减少向相同物种的其它无关的或不希望的植物的暴露,和(3)给所述雌性赋予某种形式的雄性不育以使得所述雌性亲本植物雄性不育,由此避免自花授粉的可能性,自花授粉会最终污染杂交种子。自从杂交玉米在二十世纪二十年代后期的第一次商业化以来,利用这三种组分生产杂交玉米种子的基本方法没有变化(Russell,W.A. (1974) *Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Industrial Research Conference* 29:81-101)。在杂交种子生产中,术语“污染”表示不含有雌性亲本和雄性亲本植物之间的期望的和预期的遗传杂交的种子。污染可以源自雌性植物的自花授粉,或它可以源自来自非预期雄性亲本的花粉对雌性植物的授粉。这可以是空气中花粉移动或者进入生产田地或足够靠近雌性植物以非故意地转移花粉的昆虫、野生生物、人、车辆或其它潜在花粉载体引入的花粉移动的结果。

[0007] 成功地实现生产地块的分离、从而避免不希望的授粉事件和赋予雄性不育存在挑战。获得与相同物种的其它植物分离足够大的距离的土地是困难的,且有时不可能实现。因此,对于要暴露于不希望的花粉的田地不是罕见的,由此污染在所述田地中产生的某些百分比的种子。雄性不育方法包括遗传不育,意图用作雌性来源的植物上的生殖区域的雄性部分的物理或机械除去,或杀死雄性配子的化学杀配子剂。物理和机械方法是非常昂贵的,而化学杀配子剂是昂贵的和/或不是非常有效的。细胞质雄性不育形式的遗传雄性不育被广泛用在某些作物如芸苔和向日葵中,但是在其它作物诸如玉米和稻中受到限制,其中实用性是有限的,因为并非所有的种质都是相容的(Beckett,J.B. (1971) *Crop Sci.* 11:724-727;Duvick,D.N. (1965) *Advances in Genetics* 13:1-56)。核遗传雄性不育方法主要在种子产业中开发,且仅几种形式被商品化,但是用在少数杂交生产土地中。尽管遗传雄性不育方法是比物理/机械和化学方式优选的,它们仍然需要利用大量资源,它们增加了在最短时间范围内建立特性堆叠和将产品带至市场的复杂性,且有时必须通过复杂的全球管理系统(对于需要GM0的那些)。固有地,所有在植物中赋予雄性不育的方法具有造成巨大支出和/或资源、以及限制产品或产品时间线适当地结束的共同点。

[0008] 几种经济上重要的作物目前不可培养为杂种(包括、但不限于,大豆和小麦),因为不存在赋予雄性不育的有效方法和/或物种是如此高度自花授粉的且花粉移动这么短的距离,以致于即使具有雄性不育,也可能存在差的异花授粉成功,从而导致异花授粉的杂交种子的低收率,使得杂交生产在经济上不可行。除了大豆以外,小麦是另一种有价值的作物,其迄今为止采用杂交种子生产已经取得有限的成功。一般而言,种子产业是主动追求方法以实现或改善大多数主要作物物种的杂交作物生产,由杂交作物系统实现的显著收率增加和育种效能驱动。

[0009] 对于已经利用杂交生产的作物(例如玉米、向日葵),本发明完全地或部分地消除对以前提及的所有三种昂贵的和资源依赖性的组分的需要或者降低对它们的依赖性:在雌性附近种植雄性,分离,和雄性不育。一种广泛使用的制备杂交玉米植物的方法是,将雄性和雌性亲本种植成彼此靠近,其中每个亲本具有适当的遗传构成以制备优选的杂交种子。

如将在下面更详细地讨论的,每种植物能够促成雄性和雌性配子产生种子。因此,一个亲本系将被指定为具有用作雄性来源的适当性能,而其它植物将被指定为雌性。雄性植物通常需要良好的花粉脱落能力,而雌性植物必须具有雌性生殖组织的适当暴露以及良好种子收率和其它合乎需要的遗传学。在广泛实践的方法中,从雄性脱落的花粉必须与雌性植物最有生育力的阶段重叠。雄性植物通常占田地的大约30%,该数字在雄性为花粉的差脱落者的情况下增加至更大的百分比,而雌性占田地的大约70%。雄性仅为了给指定雌性植物产生花粉而存在。因此,为雄性指定的土地相对于种子或食物生产措施不具有生产力。雄性植物也消耗有价值的资源,其中一些包括可得到的矿物质和水分。此外,被指定为雌性的植物必须就它们的雄性特征而言是不育的,以便阻止自花授粉或田地中的其它指定雌性的授粉。

[0010] 本领域技术人员会明白,本文中公开的发明的实践将随作物的本性提供不同的益处。例如,由于花粉在花内释放,甚至在花开之前,有些作物具有高自花授粉比率。这样的作物天然地经历非常高比率的自花授粉种子。本发明的实践可以降低自花授粉的百分比,但是由于自花授粉发生在花开之前,用指定雄性花粉进行的成功异花授粉的比率将低于在闭花内不具有自花授粉发生的作物中的比率。有些作物由于作物的本性和它的花粉特征不需要长隔离距离来阻止异型杂交。在这样的情况下,本发明的实践不会影响任何分离要求,但是仍然会增加用指定雄性花粉进行的成功异花授粉的比率,并且也减少自花授粉。因此,取决于培养的作物,本发明的实践可以完全地或部分地消除对前面提及的昂贵的和资源依赖性的组分中的任何一个、任何两个或所有三个的需要或降低对它们的依赖性:将雄性种植在雌性附近、分离和雄性不育。

[0011] 另外,经常难以发现与相同物种的无关植物的充分分离,所述无关植物具有造成相对于靶异花授粉的不希望的异花授粉的可能性。促进该分离同样可以是昂贵的。例如,在杂交玉米种子生产中常见的是,用其它作物(诸如大豆)包围玉米以实现充分分离。如在图2中所示,典型的玉米杂交种子生产田地100通常在所有侧面被大约201米(660英尺)的大豆作物102包围以便实现分离。在图2中,用带浅阴影的外正方形描绘大豆作物。内部杂交种子生产田地104在所有侧面具有4-8行的雄性亲本植物106的边框,如图2中的黑色正方形所描绘的。杂交种子生产田地的最里面部分种植了多行与雌性亲本植物交替的雄性亲本植物。在图2中,这以4行雌性之间的2行雄性的普通模式显示。该模式无意成为限制性的-使用许多模式,使得雄性行以普通间隔散布在雌性行之间。种植者使用多种种植模式,这取决于雄性和雌性亲本植物的特征和在给定位置可能存在的其它因素。图2产生这样的田地:大约35%的雄性亲本植物和65%的雌性亲本植物。基于大约610米(2000英尺)长且800行宽的田地,图2的布局将导致大约37公顷(92英亩)的种子生产,其被充当分离的65公顷(161英亩)大豆生产包围。对于相对小面积的种子生产,这需要大量土地面积。杂交种子生产田地的其它例子可以使用雄性和雌性亲本植物的不同组合,并且将使用哪种模式的决策经常依赖于亲本植物的特征。

[0012] 在生产或商业规模实践这样的操作是昂贵的,且经常不足以提供所需的遗传纯度。遗传纯度是种子纯度的量度。在提及杂交种子时,遗传纯度是具有雄性和雌性亲本植物之间的预期遗传杂交的种子的量度,且通常被表达为百分比。源自自花授粉(自交)或用非预期花粉的授粉(异型杂交)的种子被视作污染物,且不是杂交种子。杂交玉米种子通常必

须具有95%遗传纯度(即95%杂交种子)才能作为合格的杂交种子销售。在美国的种子证书是第四代方案,它是每个单独州的责任,并且在每个州内,存在基于各个州的种子法被指定来证明种子的机构。所述四代是育种者种子、基础种子、登记种子和认证种子。认证种子从基础或登记种子产生,并且是第四代种子证书计划的终产品。尽管每个州具有它自己的种子法,95%遗传纯度要求是常事。即使在使用推荐的隔离距离时,常见的是,不希望的花粉污染田地,因为花粉被风、昆虫和其它自然因素从紧密靠近的其它田地携带过来。

[0013] 在玉米的雌性亲本植物中诱导雄性不育的方法中,将去雄花穗用于大多数总体种子生产且是非常昂贵的,因为需要手工劳动和/或昂贵设备以从雌性植物除去雄花穗。由于玉米杂交在二十世纪三十年代的广泛采用(Crow, J.F. (1998) *Genetics* 148:923-928),种子生产已经主要以非常类似的方式发生,包括分开种植雄性和雌性的种子生产地块并将雌性行去雄花穗。本文描述的发明具有经济价值,因为它可以降低为种子生产过程销售的商品的成本(COGS)。首先,本发明会节省在去雄花穗成本上的钱。本发明可以允许以当前采用的强度的50%的平均值去雄花穗。假定350美元/英亩的当前去雄花穗成本(Draft Environmental Assessment[online], 2010. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Seed Production Technology (SPT) Process DP-32138-1Corn[在2016-06-19检索]。从因特网检索:<URL:https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf>)和仅在美国就有大约100万英亩的杂交种子生产(Weber等人, 2009. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193:79-92),本发明对种子产业将具有1.75亿美元的去雄花穗成本降低的每年价值(350美元/英亩 $\times$ 50%采用 $\times$ 100万英亩)。另外,通过减小隔离距离和减少在种子生产田地中种植的雄性的量,可以获得额外价值。遗传雄性不育方法不如去雄花穗昂贵,但是仍然给种子产业带来巨大成本,以开发具有正确基因/细胞质的雌性系,以接受政府管理批准来利用所述基因(如果它们被视作GMO),和引入由开发过程时间线稍微延迟的产品。因为这些原因,遗传雄性不育被用于在美国生产的总玉米杂交单元的少数中。类似地,化学雄性不育诱导被用在少数几种作物中,且被认为是昂贵的、相对无效的和并非广泛适用的。

[0014] 因此,在产业中需要减少以上缺点的影响或完全消除以上缺点的发明。这样的发明可以减少或完全消除对在雌性亲本植物紧密靠近处种植雄性亲本植物的需要,或减少需要的雄性亲本植物的数目。另外,通过更受控的授粉操作方式,本发明可以减轻或显著减小以下需要:与相同物种的其它无关植物分离地种植种子生产田地。同样地,本发明能够使用更短的隔离距离。此外,本发明可以减少或消除为了避免自花授粉在指定雌性亲本中采用某种形式的雄性不育的需要,由此极大地减少或完全消除劳动密集的去雄花穗过程或使用其它雄性不育方法。

[0015] 另外,对于不可作为杂种培养或由于形态学结构挑战或当前育种实践而难以杂交的作物,本发明可以实现杂交种子的生产并在可使杂交生产成为种子产业的经济上可行选项的成本实现商业水平量的生产。杂交小麦的努力已经进行了超过80年,在经济地生产种子中几乎没有成功,尽管在小麦杂交优势中存在大于20%的收率增加潜力(Pickett, A.A. (1993) *Adv. Plant Breed.*, Suppl. J. *Plant Breed.* 15:1-259)。经济地生产杂交种子的系统,诸如本文描述的发明,将具有巨大价值。假定10%的杂交小麦相对于变种小麦的中等收率增加,并假定1/3的小麦田将转化成杂交,将存在对于整个价值链而言全球每年43亿美元的价值。这是基于2014年的729MM公吨的全球小麦生产(联合国粮食和农业组织(Food and

Agriculture Organization of the United Nations,FAOSTAT))和每公吨180.32美元的小麦商品价格(2016年6月13日小麦价格[在线,2016-06-13检索]从因特网检索:<URL:https://www.ams.usda.gov/market-news/livestock-grain-market-news-publications>)(计算:180.32美元/MT x 729MM MT x 10%收率增加x 33%杂交采用)。该总价值是保守的,因为种子产业声明,在杂交小麦的大约33%采用下,通过单独种子销售实现的潜在总价值获得是每年大约30亿美元(Syngenta Investor Day 2015Presentation[在线],第20页[在2016-06-19检索]。从因特网检索:<URL:http://www4.syngenta.com/~media/Files/S/Syngenta/events-and-presentations/plenary-presentation-rndday2015-trish-malarkey.pdf>)。在世界范围规模的数目大得多。

附图说明

[0016] 图1:该图指示从1866年至2011年在美国每英亩的玉米作物的逐渐增加的平均收率(按蒲式耳计)。来源:University of Missouri Extension网站。

[0017] 图2:该图代表典型玉米杂交种子生产田地的俯视图。外面浅色阴影的正方形是分离框,通常种植大豆。里面黑色正方形代表雄性亲本植物,且里面田地是雄性和雌性亲本植物的交替行模式。

发明内容

[0018] 提供了一种种子生产方法,其中通过减少污染来提高得到的种子的遗传纯度,所述方法包括:培养包括雌性和雄性组分的指定雌性亲本植物;当所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分不释放有活力的花粉时且当其它生物学上相容的花粉来源也不释放有活力的花粉时,在一个或多个时机用指定雄性植物花粉对所述指定雌性亲本植物有意授粉;使所述指定雌性植物生长至成熟;和收获由所述指定雌性植物产生的种子。此外,所述方法包括减少或消除对一种或多种以下条件的需要:所述指定雌性植物的雄性不育;所述指定雌性植物与任何生物学上相容的花粉来源的物理和/或时间分离;和要在所述指定雌性植物附近培养的雄性授粉植物。

[0019] 本发明的另一个实施方案包括新鲜的或保存的指定雄性植物花粉的应用。所述花粉可以已经从田地、生长室、温室、玻璃房、遮蔽房、拱形温室、垂直农业设备或无土栽培设备中的一种或多种收获。保存的花粉可以已经通过允许花粉保留生存力的任何方式保存,所述方式包括但不限于各种形式的冷藏(cooling)或冷冻(freezing),包括但不限于冷却(chilling)、深低温保藏(cryopreservation)、冷冻干燥或在液氮中贮存。此外,所述花粉(无论新鲜的还是保存的)可以已经从以下来源收集:具有改变的昼夜节律的来源,具有正常昼夜节律开花但是其中所述指定雌性亲本(patent)植物的所述雄性组分被延迟的来源,或具有正常昼夜节律开花但是其中允许所述指定雌性亲本植物的所述雄性组分没有延迟地脱落的来源。所述花粉(无论新鲜的还是保存的)可以已经从一种或多种遗传学来源收集,且可以在应用之前已经与来自其它遗传学来源的花粉组合。

[0020] 在某些实施方案中,在超过一个时机将所述雄性植物花粉应用于相同指定雌性植物。本发明的实施方案包括在指定雌性亲本植物首次变成可接受所述花粉时应用所述指定雄性植物花粉。另一个实施方案包括应用处理以延迟雌性亲本植物的雄性组分的成熟。

[0021] 所述方法适用于宽范围的植物,包括但不限于玉米、大豆、小麦、稻、向日葵、芸苔、高粱、棉花、大麦、珍珠粟和苜蓿。

[0022] 提供了一种生产任何植物物种的种子的方法,所述方法包括:在指定雌性植物亲本处于雌性组分准备好接受花粉、但是雄性组分没有释放花粉的情况下,将指定雄性花粉有意应用于指定雌性植物。此外,所述指定雌性亲本不需要包括雄性不育,且不需要与不希望的生物学上相容的花粉来源分离。

[0023] 指定雄性花粉的应用可以通过自动化装置、机械装置、手动装置、气动装置、正压装置、负压装置、半自动化装置或它们的组合进行。此外,所述指定雄性花粉来源可以来自以前保存的或新鲜收获的来自雄性来源物质的花粉。

具体实施方式

[0024] 下面是实现改进的杂交种子生产的技术和方法的一个实施方案的详细描述。这样的技术和方法可以用于从任何植物制备杂交种子。为了容易讨论和理解,下述详细描述经常提及使用玉米(也被称作玉蜀黍)的发明。应当理解,所述技术和方法可以与任何产生种子的植物一起使用,并且玉米或其它特别提及的植物仅为了例证目的而讨论,且无意成为限制性的。类似地,所述技术也可以用于在一般的亲本生产和/或种子生产中减少污染和增加遗传纯度。可以使污染减少任何量,包括但不限于5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或任意其它量。在优选的实施方案中,可以使污染减少至少30%,诸如30%或更多、40%或更多、或50%或更多。

[0025] 为了许多目的生产种子,包括杂交种子。首先,为了多种研究目的生产种子,以评价遗传学的新组合的价值。种子公司在开发更好植物遗传学的寻求中花费数十亿美元进行研究。生产杂交种子的另一个原因是用于将这样的种子商业销售给生产者,诸如农夫。另外,生产种子来制备亲本种子,其用于在杂交种子生产田地中培养亲本。本发明可以用于生产为任意目的而生产的任何杂交或非杂交种子。不论所述种子的最终用途,杂交种子的生产取决于给适当雌性受精适当雄性花粉。一种改进的杂交种子生产方法包括从雄性亲本植物收集、储存花粉和将所述花粉递送至雌性亲本植物。一些收集花粉的方法是本领域已知的。例如,美国专利4,922,651公开了用于实现或改进植物授粉的设备。

[0026] 另外,一些花粉递送方法(诸如美国专利4,922,651)是本领域已知的。另外,多种花粉贮存方法是已知的。例如,美国专利5,596,838(涵盖了用于制备花粉进行低温贮存的方法和器械)教导,可以将花粉储存几个月的时间段且仍然保持活力。尽管一些花粉递送方法是已知的,这些方法没有教导、提示或激励用户以消除对分离和/或雄性不育的需要的方式有意地递送花粉,所述分离和/或雄性不育在当前技术中在支持用在大规模田地研究中或生产商业杂交种子中总是所需要的。本发明导致在活跃期之外发生的授粉,其中所述植物可能进行自花授粉和/或暴露于其它不希望的授粉,且因而不需要使用雄性不育或分离,尽管可以采用一种或两种而不脱离本发明的范围。此外,在某些植物(诸如小麦)中,雄性花粉不会移动足够远到有效地产生杂交(Loureiro, I.等人(2007) *Euphytica* 156:25-37; Dong, S.等人(2016) *PLoS ONE* 11(3):e0151373.doi:10.1371/journal.pone.0151373)。本发明在产业中通过依赖于有意授粉来补救该问题,其中将花粉有效地递送至雌性亲本植

物。

[0027] 如以上所讨论的,本发明适用于种植雌性亲本种子的一般实践,所述种子将萌芽和变成带有种子的植物,所述植物将带有杂交种子以最终销售给农夫或其它客户或生产种子用在研究计划中。但是,不是在雌性植物紧密附近处种植雄性亲本种子(如使用当前实践的情况),本发明提供了一种改进的替代方案,其中在特定时间将雄性花粉有意地应用于雌性植物。术语“有意”关于花粉应用的使用是指,通过风、昆虫活动或其它天然存在的条件,以不包括天然授粉的方式对花粉的具体应用。有意应用的花粉是作为审慎人活动、决策或干预的结果已经应用于植物的花粉,且可以用手或用其它方式应用。有意花粉应用的一个例子是花粉的“惯例”应用,其是使用花粉来解决田地中的特定需要或条件。尽管特定时间是优选的,但如将在下面详细讨论的,本发明的一个方面是在一天的任何时间在田地中授粉的优点。在本发明的所有方面,可以从一个或多个遗传学来源得到花粉。

[0028] 制备杂交种子所需的雄性花粉[有时称作“花粉^M”]的获取可以是通过花粉库。花粉库是储存的花粉的来源,所述花粉已经从一个或多个花粉来源收集并且以所述花粉保留它的生存力的方式储存。已经用作这样的花粉库的花粉来源的植物可以已经在任何条件下生长和收获,包括但不限于田地、生长室、温室、玻璃房、遮蔽房、拱形温室、垂直农业设备或无土栽培设备。来自花粉库的花粉可以已经以不同的方式溯源(sourced)。例如,在一个实施方案中,可以在受控环境中生长的雄性植物收获新鲜花粉,在受控环境中昼夜节律比在田地中的天然地生长的雌性植物早2-8小时。该方法将在下面进一步详述。在另一个实施方案中,在所述库中储存的花粉可以是这样保存的花粉:其在为了授粉目的从所述库最终取出它之前数天、数周、数月或数年收集。保存的花粉可以已经通过允许所述花粉保留生存力的任何方式保存,所述方式包括但不限于各种形式的冷却或冷冻,包括但不限于冷却、冷冻保存、冷冻干燥或在液氮中贮存。

[0029] 在一个或多个实施方案中,可以从花药室收获花粉。花药室能够实现任何植物物种或品种的雄性植物生殖组织的最佳生长条件。从在标准户外条件中(诸如在田地中)生长的植物或在受控条件(诸如温室或生长室)中生长的那些植物切下组织(例如玉米雄花穗)。优选地,在所述植物开始脱落花粉之前切割所述组织,并放在花药室中。然后将所述组织在允许进一步生长的营养培养基中培养。专门光照、温度和/或湿度中的至少一项可以在花药室中循环,从而允许所述组织的继续生长。可以调节生长以增加或减慢生长速率,并因而调节花粉的可用性的持续时间。这会实现获得应需要的花粉用于授粉的能力,所述授粉可以在白天或晚上的任何时间完成。这对于与种子和谷物生产有关的几个有益的和有价值的过程的授粉实现具有实用性。还提供了用于保存目的的浓缩花粉来源。从花药室收获和保存的任何花粉可以以与新鲜收获的花粉相同的方式利用,但是在没有保存的新鲜花粉已经死亡以后很久的持续时间(R.I.Greyson(1994) Maize inflorescence culture. 第712-714页。见:M.Freeling,V.Walbot(编),The Maize Handbook;Springer-Verlag,New York;J.B.Schoper,R.J.Lamber,B.L.Vasilas,和M.E.Westgate(1987) Plant factors controlling seed set in maize.The influence of silk,pollen,and ear-leaf water status and tassel heat treatment at pollination,Plant Physiol.83:121-125)。

[0030] 一旦雌性可接受花粉(这总是先于指定雌性亲本的花粉[有时称作花粉^F]在任何

给定天变得有活力),花粉^M的递送(其可以是通过机械装置、正压装置、负压装置、气动装置或其它装置)就发生,从而实现这样的时间窗口:在此期间成功的异花授粉可以与所有有接受力的雌性发生。换言之,植物的雌性组分敞开以接受来自雄性的花粉,然后相同植物的雄性组分实际上准备好产生花粉。在玉米中,雌性在花丝出现之前可接受花粉且在外壳出现之后持续许多天。此外,在玉米中,存在两种可能性:花粉可以在花丝出现之前脱落(雄性先熟),或花丝出现可以先于花粉脱落(雌性先熟)。在任一种情况下,一旦花丝是有接受力的,它们将在花粉在给定天脱落之前可接受花粉。本发明适用于两种情形。此外,在某些实施例中,花丝全天可接受花粉,持续约7天。因此,可以有意应用花粉任意次数,包括但不限于,每天1次、每天2次或连续应用。在不使用雄性不育的情况下,花粉^F通常将在上午中期开始脱落,并持续至上午晚期或下午早期,此后所有花粉^F要么找到有活力的雌性并萌芽,从而实现成功的自花授粉,要么在60分钟或更短时间内死亡(如果它没有着陆在有活力的雌性上)(Luna V.等人(2001)Crop Sci.41(5):1551-1557)。因而,雌性玉米植物具有每天时间窗口,在这期间可以递送雄性花粉且在这期间花粉^F没有脱落。该窗口将在几天中重复。由于本发明在时间窗中(在此期间花粉^F没有脱落或不是有活力的)对几乎所有有活力的雌性异花授粉,不需要雄性不育来避免自花授粉的种子。

[0031] 因此,本发明的一个方面是向雌性亲本递送花粉的时机。在所有作物中,在授粉窗口(在其中雌性可接受花粉且在其中成功的授粉事件可以发生的时间)中存在每日循环,其中雌性相对连续地成熟和生长,而雄性具有不同的周期,其中花粉变得有活力和脱落,或者从花药裂开,开始于上午中期并结束于上午晚期或下午早期。在某些情况下,花粉^F可以在雌性变得能育之前变得有活力,但总是存在第一个早晨:此时有活力的雌性变得能育,此后有活力的花粉^F开始在该天脱落。因此,可能在前一天已经脱落的花粉^F已经死亡很久并且变得不可存活,然后雌性在次日早晨变得有活力。因此,上午早期至中期对于花粉^M的应用而言是理想的,以在花粉^F开始脱落之前不久偶然地异花授粉所有有活力的雌性,尽管人们可以选择在花粉^F开始脱落之前几天、或在当天的几个时间、或以连续方式应用花粉,以增加成功地制备纯的杂交种子的概率。在一个实施例中,可以在上午6:00递送花粉。但是,花粉的递送可以发生在一天的任何小时,从而提供胜过传统方法的巨大优点。因而,当花粉^F开始脱落时,所有有活力的雌性已经被选择的花粉来源授粉,并且花粉^F在短时间段以后死亡,而没有发现任何有活力的雌性,由此避免在以前的杂交系统中需要某种形式的雄性不育的雌性的自花授粉。不同的花粉种类具有不同的寿命,这可能受环境条件的进一步影响(Dafni,A.和D.Firmage(2000)Plant Systemics and Evolution 222(1):113-132)。较高的湿度和较低的温度可以延长花粉寿命。例如,在稻(亚洲栽培稻(*Oryza sativa*))中,已经发现花粉寿命短至4分钟(Koga等人(1971)Cytologia 36:104-110)或多达20分钟(50%的花粉死亡)(Khatum,S.和T.J.Flowers(1995)J.Exp.Bot.46:151-154)。相反,证实了田地生长的萝卜(萝卜(*Raphanus sativas*))花粉具有5天寿命(Siddiqui,B.A.(1983)Acta Bot.Ind.11:150-154)。

[0032] 因此,本发明利用以下事实:一旦建立雌性对花粉的感受性,植物的雌性组分通常在花粉在给定天脱落之前可接受花粉,即使在花粉首先全部脱落、然后雌性可接受花粉的情况下。在大多数(如果不是全部的话)植物中,这以每日节律发生,诸如对于玉米,其中雌性组分可接受花粉且雄性组分没有准备好(直到至少每天的露水干燥以后,这在某些实施

例中可以是在上午10:00或在阴天或雨天迟至下午1:00)。此外,在某些差天气或雨天,雄性组分可能严重地延迟或可能不会实际上脱落花粉。在许多作物(诸如大豆)中,雌性组分可以比雄性组分早一天准备好。雌性经常比所有雄性早准备好且基于每天。因此,授粉(在早晨的第一件事情)经常导致期望的花粉的授粉。此外,具有在每个时间(其中雌性首先变得可接受,不论当天的时间)授粉的能力是胜过当前实践的巨大优点。

[0033] 通过在适当时间递送花粉和植物的能育性窗口的适当持续时间,可以在不使用在雌性植物中的任何形式的雄性不育的情况下实现适当纯度。这是首次不使用某种形式的雄性不育在任何作物中建立商业杂交种子生产。因此,这是本发明的一个新颖方面。此外,由于几种作物(诸如大豆)不具有经济上可行的雄性不育的形式,本发明能够在以前没有可能性(例如大豆)或具有困难(例如小麦)的物种中实现杂交种子生产。以相同的方式,本发明首次在不使用与不希望的生物学上相容的来源(花粉^U)物理或时间分离的情况下实现了有效杂交种子生产。因而,当花粉^U开始脱落时,所有有活力的靶雌性已经被选择的花粉来源授粉,且花粉^U在短时间段(1-4小时)以后死亡,这取决于物种和环境条件(Luna V.等人(2001)Crop Sci.41(5):1551-1557;Stanley,R.G.&Linskens,H.F.(1974)Pollen: Biology,Biochemistry,Management.Springer-Verlag,Heidelberg.;Shivanna,K.R.(2003)Pollen Biology and Biotechnology.Science Publishers,Inc.),没有发现任何有活力的靶雌性,由此避免在以前的杂交系统中需要某种形式的分离的雌性的交叉污染授粉。

[0034] 根据需要递送有活力的花粉以实现有接受力的花丝的及时授粉的能力解决了田地规模的杂交种子和谷物生产共有的许多限制。具体地,本发明的惯例应用克服了低水平的花粉产生,消除了雄性和雌性花之间的差生殖同步,并减少了杂交种子生产中的物理分离的高支出。

[0035] 本发明的实施方案包括解决(addressing)传统分离技术的一系列选项。如以上所讨论的,传统分离技术可以包括物理分离。解决物理分离的选项范围可以包括与花粉^U分离的完全消除,以及减少花粉^U污染所需的隔离距离的减小。在美国玉米杂交种子产业中用于分离以与其它玉米分离含有雄性和雌性亲本系的杂交种子生产田地的标准距离是201米(660英尺)或更多(Iowa Seed Certification Requirements Handbook,Iowa Crop Improvement Association,2009)。尽管该距离可以随州变化,该距离通常是重大的,以便防止风促进的花粉漂移以及昆虫促进的授粉。通过与任选地减少或消除杂交种子亲本的隔离距离组合地利用本文中公开的本发明的技术,可以实现一系列增加的遗传纯度提高。例如,将本发明的授粉方法与隔离距离的减小组合,将导致得到的杂交种子的提高的遗传纯度水平。所述隔离距离可以从201米减小至180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5或1米的隔离距离,或所述隔离距离可以完全消除,使得杂交亲本植物种植成直接靠近不是预期杂交亲本的其它玉米。随着隔离距离减小,存在较低纯度水平的较高可能性,但是因为本文中公开的授粉技术的效力,实现的纯度水平仍然可以是在杂交种子的生产和销售的要求标准内。与外来花粉来源的物理分离的传统要求给杂交种子生产添加了巨大支出。根据本发明的花粉在局部花粉脱落之前在足以确保高受精水平的剂量向有接受力的花丝的直接应用克服了对实践种子田地分离的需要。

[0036] 除了物理分离以外,时间分离是可以用于将雌性与花粉^U污染分离的技术。当将雌

性和不希望的雄性在不同时间种植时,发生时间分离,使得雌性花丝和花粉^U在不同时间可得到。在一个非限制性实施例中,可以将雌性和雄性间隔一个月种植。这样的技术最常用在热带和亚热带气候中。本发明的实施方案同样包括解决时间分离的一系列选项。解决时间分离的选项范围可以包括与花粉^U分离的完全消除,以及减少花粉^U污染所需的分离次数或量的减少。因为本文中公开的授粉技术的效力,实现的纯度水平仍然可以是在杂交种子的生产和销售的要求标准内。

[0037] 雄性和雌性花开花期之间的紧密同步和每个暴露的花丝的最小花粉密度是高水平种子生产和遗传纯度的基本要求。可以在7-10天的时间段中将以前收集和保存的花粉或新鲜花粉应用于有接受力的花丝,从而确保种子组(seedset)处于降低的花粉生存力的条件下,相对于花粉脱落抽丝延迟,或雄性和雌性近亲交配体之间的差‘切口’(nick)。在农产业中,“切口”是在杂交种子生产中使用的术语,其表示在理想时间发育的雄性和雌性花型的同步(即雄性的花粉脱落峰与雌性中的花丝出现峰对齐),使得花粉颗粒将成功地授粉,从而导致受精。对于种子生产者,当50%的雄性群体开始在同一天脱落花粉、同时50%的雌性群体开始产生花丝时,发生完美“切口”。

[0038] 如果将本发明的授粉技术与田地中去雄花穗的量的减少串联使用,纯度提高的类似系列得以适用。去雄花穗标准实践要求,允许不超过1%的雌性雄花穗脱落花粉(Iowa Seed Certification Requirements Handbook, Iowa Crop Improvement Association, 2009)。为了实现该目的,去雄花穗人员可能需要在4-5个连续天和在不同强度水平(去雄花穗人员在任何给定通道在田地中移动的速度)穿过田地。通过利用本文中公开的本发明的技术,可以减小去雄花穗通行和/或强度,从而允许超过1%的雌性雄花穗脱落,同时仍然得到可接受的遗传纯度。允许脱落的百分比可以从1%、2%、3%、4%、5%增加至10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在100%的情况下,不需要去雄花穗。

[0039] 如果将本发明的授粉技术与为了将雌性田地成功授粉以得到必要的遗传纯度水平需要种植的雄性植物的数目的减少串联使用,纯度提高的类似系列得以适用。在典型的玉米杂交种子生产田地中,雄性亲本植物存在范围为田地中的植物的20%至40%(Basra, A.S. (1999) Heterosis and Hybrid Seed Production in Agronomic Crops, 第48页)。需要的雄性亲本植物的百分比将取决于许多因素,包括来自雄性亲本植物的花粉将表现出的预期花粉活力和生存力,以及与特定土地面积和气候有关的因素。本发明的实践将允许在田地中需要的雄性植物的百分比的显著减小,或允许它们的完全消除。例如,不是在生产场合中需要40%雄性亲本植物,而是可以在田地中使用更小百分比,诸如35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或甚至0%的雄性亲本植物。根据本发明的花粉的惯例应用具有从种子田地完全消除雄性授粉者的潜力。

[0040] 此外,纯度提高的类似系列还可以应用于作物,在这些作物中一株或多株植物可以在植物开花之前自花授粉,且能够接受其它来源的花粉。这样的作物的一个非限制性例子是小麦。本发明对于这样的作物可以是有利的。例如,可以应用有限的雄性不育和/或分离。此外,可以将雌性繁育成较早开花或进行机械或物理紊乱以造成花打开。在有些时候还可以迫使花粉进入花中。即使在有些自花授粉与这样的事件不可避免的情况下,适当的杂交授粉可以发生在其中花朵早于自花授粉打开的植物中。在这样的情况下,遗传纯度得以提高。

[0041] 花粉颗粒是小的且可以是非常精巧的。它们的将雌性成功授粉的能力可以被许多环境应激损害,并且也可以是产生花粉的植物传递的固有性质。花粉性能(即萌发速度、管生长的活力)可以被称作花粉活力,而花粉成功产生有活力的种子的能力可以被称作花粉生存力(Shivanna, KR等人(1991) Theor. Appl. Genet. 81 (1):38-42)。花粉活力和生存力可以在植物种、品种和变种之间显著变化。在某些情况下,可能合乎需要的是,使用通常具有差活力和/或生存力的花粉实践本发明。在这样的情况下,尽管预期本发明的实践会增加收率和提高纯度,这些特征中的每一个的提高百分比与使用具有更高活力或生存力的花粉相比可以是低的。因此,通过本发明的实践可以实现的纯度和收率的连续提高可能依赖于宽范围的因素,包括花粉活力和生存力。在纯度提高较小的情况下,可以采取额外步骤来提高纯度水平,如在本公开内容中以后描述的。

[0042] 本领域技术人员明白,要在本发明的实践中使用的雄性花粉的选择是通过实践本发明认识到的潜在益处的一个重要因素。花粉活力和生存力,以及花粉可以赋予的各种性质和特征是考虑方面。可能存在这样的情况:因为它将通过得到的种子赋予的性质,使用具有较低活力或生存力的花粉仍然是一个好选择。在这样的情况下,当已知花粉具有较低活力或生存力时,应当预见到得到的更有节制的(moderate)污染减少,以及更低的潜在收率增加。基于作物的特定特征、期望的种子和在预期的关于影响作物的环境压力和其它生物压力和/或非生物压力的授粉时间的优势条件,种植者可以做出这样的决策。因此,在授粉时选择花粉的能力是通过实践本发明认识到的潜在益处的另一个重要因素。下面表1概述了使用本发明的选定的潜在益处。

[0043] 表1:花粉选择的实例益处

[0044]

生产问题	本发明的应用	预期的益处
通过雄性近交实现的差花粉产生,不适合用于在田地规模的杂交种子生产	根据需要应用于有接受力的花丝由此增加授粉的新鲜的或保存的花粉的应用	在杂交开发中利用精华雄性近亲交配体的更大潜力
在亲本种子田地中低水平的种子生产	根据需要应用于有接受力的花丝由此增加授粉的新鲜的或保存的花粉的应用	通过精华雄性和雌性近亲交配体实现的更大种子生产
雄性和雌性之间的差生殖同步,在杂交种子生产	根据需要应用于有接受力的花丝由此增加授粉	增加的每英亩种子收率,减少的雌性近亲交配体

[0045]

中的近交导致低种子收率和高于可接受水平的遗传污染	的新鲜的或保存的花粉的应用	的自花授粉,减少的来自偶发来源的异系杂交
由与外来花粉来源的物理分离的需要引起的杂交种子生产的高支出	根据需要应用于有接受力的花丝由此增加授粉的新鲜的或保存的花粉的应用	在足以确保在局部花粉脱落之前高达 100%受精的剂量向有接受力的花丝直接应用花粉克服了对实践种子田地分离的需要
单培养物田地的近交效应,其中授粉是通过相同遗传组成的植物,诸如通过自花授粉或近缘授粉	根据需要应用于有接受力的花丝由此增加授粉的新鲜的或保存的花粉的应用	增加的每英亩种子收率,减少的雌性近亲交配体的自花授粉,减少的来自偶发来源的异系杂交

[0046] 下述非限制性实施例提供了一种在其中可以实践本发明的潜在情形,并概述了益处。在由差脱落雄性(使用常规方法其需要35%或更多的雄性存在于杂交种子生产田地中)组成的杂交的情况下,可以实践本发明,且仍然导致临界可接受的污染(~5%)。本发明可以使雄性存在减少一半至17%存在,同时也将污染降低至可接受的水平(2-3%),并降低销售的商品的成本。可替换地,如果雄性是高于平均值的花粉脱落者,且在以前亲本中捕获和保存的花粉增加,本发明可以实现雄性的消除和使去雄花穗强度(和成本)降低50%,从而导致销售的商品的成本的降低,同时将污染维持在等于常规实践的水平(2-3%),但是在显著低于不实践本发明时相同参数(50%去雄花穗强度和不存在雄性)的污染水平。

[0047] 花粉^M可以以任意数目的方式递送,包括但不限于,手工递送,使用用于半自动化分散的小手工机械装置的手工递送,使用含有花粉分散机械装置的田地驱动机械装置,或经由自抛射的和/或人引导的设备实现的完全自动化分散,诸如具有固定的花粉分散装置的无人驾驶飞机,其中所述花粉分散是通过自动装置实现,包括但不限于,机械装置、正压装置、负压装置或气动装置。无人驾驶飞机的应用在该方法中可以是特别新颖的和实用的。不需要管控的小无人驾驶飞机可以用在所述方法中,且可以使用GPS坐标引导以将花粉分散直接在雌性植物上面聚焦。通过使用这些方法中的任一种,发明人已经估计,偶然地递送3-4个连续天的约140克(5盎司)花粉^M足以成功地异花授粉1公顷(2.47英亩)玉米雌性亲本植物,其具有足够的纯度以满足如前文所述的美国当前州种子法,其通常要求小于或等于5%污染(自花授粉和异型杂交污染种子组合),以便使种子获得认证和商业销售。该估计是基于提供了每mg的玉米花粉颗粒数目并估计成功的授粉需要每个花丝大约4-5个颗粒或花粉或更少(每个花丝3-4个花粉颗粒是授粉领域的技术人员普遍接受的,因为需要该量以确

保成功的授粉)的文献(M.E.Westgate,J.Lizaso,W.,Batchelor(2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize,Crop Science 43:934-942;M.Uribe-larrea,J.Carcova,M.E.Otegui,M.Westgate(2002) Pollen production,pollination dynamics,and kernel set in maize,Crop Science 42:1910-1918)。参见,例如,Porter(1981) Environ.Health Perspectives 37:53-59;Miller(1982) In Maize for Biological Research.W.F.Sheridan(编),第279-293页)。可以根据情况在必要时调节花粉递送的时机、需要的花粉的量和花粉递送的天数,所述情况可以变化,诸如各雌性亲本产生的花粉的量的变化和气候模式(即降雨频率或量,风速和方向,等)。例如,可以为任何给定的亲本集合调节和定制方法,这取决于雄性和雌性的花粉生产能力。此外,预见到,这些递送方法的效率将减少杂交授粉所需的花粉的量。发明人估计,平均而言,这些更有效的方法可以使用当前为杂交种子生产所产生的花粉的量的1/1000或更少。发明人的研究表明,当在田地中从玉米雄花穗正常脱落时,完美的玉米颗粒集合需要每个花丝约3000个花粉颗粒。人工授粉研究和开放田地研究表明,每个花丝约3-4个花粉颗粒会确保颗粒集合(M.E.Westgate,J.Lizaso,W.,Batchelor(2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize,Crop Science 43:934-942;M.Uribe-larrea,J.Carcova,M.E.Otegui,M.Westgate(2002) Pollen production,pollination dynamics,and kernel set in maize,Crop Science 42:1910-1918)。这导致杂交种子生产当前所需的花粉量的约1/1000的比率。

[0048] 因此,本发明的实践同时消除了对在雌性亲本植物附近存在雄性亲本植物的需要以及对任何形式的雄性不育存在于雌性亲本植物中的需要。此外,本领域技术人员可以在必要时容易地从上面列出的实施例进行变化。例如,在某些情形中,可能有利的是,在晚上进行授粉。在其它情形中,可能有利的是,全天进行授粉。预见到,在雌性亲本的天然花粉脱落之前定时发生的任何花粉释放都将是有效的。

[0049] 本发明可以在任何作物植物中运作以改善或实现杂交种子生产。它可以在任何环境中运作,包括但不限于,理想或靶生长环境、淡季环境或受控环境(例如遮蔽房/玻璃房/温室/拱形温室、生长室、垂直农业设备、无土栽培设备、气雾栽培设备等)。一旦雌性有活力就可以应用花粉^M,且不论花粉^F或其它不希望的花粉的生存力,只要所有当前有活力的雌性在花粉^F或来自不希望的来源的其它花粉没有活跃地脱落的阶段中被异花授粉。本发明也可以用于改善当前的种子生产实践,即使当所有常规组分都存在时,从而在挑战性生产情形中提高杂交种子纯度水平,即使采用雄性不育和/或分离和/或雄性植物。本发明可以应用于亲本增加田地—在其中种植特定基因型的近交种子并允许自花授粉的田地。来自该自花授粉的得到的种子集合产生大得多的量的近交种子,其将用于在以后日期制备杂种的亲本来源。在不育(sterile)雌性亲本的亲本增加田地中使用本发明避免了对存在分离或保持系(类似于细胞质雄性不育系,但是具有有活力的花粉并产生正常种子)的需要。同样地,可以将本发明应用于正常亲本生产田地以提高得到的种子的纯度。本发明也适用于研究场合以消除以下需要:每天将芽装袋以避免交叉污染或避免在分离的杂交地块(用于小量制备实验性杂交种子)中去雄花穗。

[0050] 在需要非常高纯度水平的情况下,或在没有预期纯度象期望的那么高的情况下,可以采取其它步骤来将杂交种子批次从自身和交叉污染的种子(其在已经从任何杂交生产

地块收获的种子混合物中,包括任何作物的常规杂交系统)纯化至任何期望水平。类似地,由于本文描述的发明可以在不同的精练水平执行,可以使用其它步骤将种子批次纯化至任何期望的纯度水平。例如,采用雄性亲本系中的遗传标记物(其在花粉^M中传递且在得到的种子中表达为独特的和可辨别的表型)将允许通过分选进一步纯化种子批次。这样的方法的例子公开在国际公开W0 2014/147005中。此外,该性质的技术通常用在白色种子玉米产业中,其中白色和黄色玉米可以用自动化的种子分选仪容易地分选。所述遗传标记物可以赋予基于种子颜色、种子颜色强度或模式、种子形状、种子尺寸、种子密度或其它种子特征可辨别的表型。种子公司可以采用它们自己的不同于其它公司的特殊标志物,诸如独特天然种子特性或肉眼可能看不见的遗传修饰的颜色标志物。然后可以将种子基于标志物表型在视觉上或机械地分选。参见,例如,Raboy等人(2000) *Plant Physiol.* 124:355-368; Evans, M.M.S. 和 Kermicle, J.L. (2001) *Genetics* 159:303-315; Jenkins, M.T. (1925) *J. Heredity* 16:307-310; 和 Chase, S. (1949) *Genetics* 34:328-332)。对于在劳动力非常廉价的发展中国家的某些作物,这可以手工地完成,而在其它情形下,具有自动化的或半自动化的种子分选仪(诸如例如Satake种子分选仪)或能够扫描和分选种子的光学扫描系统将是更经济的。

[0051] 例如,在玉米中,天然特性紫色胚芽(PP) (Chase (1949) *Genetics* 34:328-332) 可以用作繁育进所有雄性近亲交配体中的雄性表型标志物,且经由花粉^M遗传,用自动化的种子分选仪作为分选方法。本发明可以如上所述进行,但是使用包括标志物的雄性,所述标志物可以用于测量得到的杂交纯度水平。收获以后,种子的子样品的快速测定可以确定PP种子是否具有足够高的纯度以避免增加纯度的种子分选。如果不具有规定的水平,可以使种子穿过自动化的种子分选仪,例如,以将PP种子(代表杂交种子)与无色胚种子(代表自花授粉和异花授粉的污染种子)分离。这可以与在种子生产工厂中的正常调理过程一致地完成。此外,非杂交无色胚种子可以作为谷物销售或者抛弃。

[0052] 可以用在玉米中的标志物的例子包括但不限于白色/黄色胚乳、黄色/橙色胚乳、不透明的/正常的胚乳、正常的/紫色胚芽、无色/紫色糊粉、淀粉胚乳突变体、或这些标志物和其它玉米标志物的任意组合。在大豆中,可以使用的标志物包括但不限于绿色和黄色子叶。非作物特异性的转基因标志物包括但不限于颜色标记物基因(诸如DsRed2)或改变任何正常种子表型的任何转基因,诸如增加种子部分中的花青苷或其它色素的转基因或改变子叶颜色的转基因。这样的标志物的其它例子可以参见国际公开W0 2014/147005。

[0053] 当达到显著优于通过没有雄性不育和/或用小于标准分离的常规方法得到的结果的杂交纯度结果、但是没有达到对于商业销售而言足够高的纯度水平时,使用标志物的分选步骤的额外应用是最适当的和经济的。例如,基于发明人的数据估计,在没有雄性不育或分离的通常应用下在用于玉米生产的杂交种子批次中的污染(主要来自雌性自花授粉)将大于70%,而也没有雄性不育或分离、使用本发明的技术培养的种子批次的污染水平可以使污染减半或更多,达到35%污染或更少。尽管35%的污染没有像对某些作物(如玉米)要求的那么低,对于当前的非杂交作物如大豆,这足以开始生产作物作为杂种。例如,在一种涉及大豆的先前方法中,为了开发育种杂交,在人工杂交中达到了约70%纯度。在玉米中,也存在基于田地的以下证据:在更高的收率水平,减少了外来花粉污染(Astini, J.P. 等人(2009) *Agronomy J.* 101:373-380)。通常,在任何分选步骤中分选出的非杂交种子作为谷物

销售。通过使用本文中公开的发明,可能将非杂交种子分选成两类——一类谷物(异型杂交和其它非自身污染物)和可以作为自花授粉品种销售的第二部分(自交),从而提供分选方法的附加值副产品。

[0054] 本领域技术人员会明白,由本发明的实践引起的额外益处是增加的种子收率。花粉向能育的雌性亲本植物的审慎和有意应用将导致与天然存在的授粉相比增加的授粉事件。取决于选择用于实践本发明的花粉^M,授粉率可以显著增加,且作为结果,收率也将显著高于另外可以达到的收率。平均而言,发明人预见到作为本发明的实践的结果的至少15%的收率增加。取决于雌性亲本植物的状况、使用的花粉的选择、环境条件和其它因素,预见到与没有实践本发明的方法的预期收率相比,显著超过10%的收率增加,包括在某些情况下超过100%的收率增加。

[0055] 以下实施例更详细地举例说明本发明,并且是如何在玉米中实现本文描述的发明的示例。该基础方法可以适用于具有适当的作物特异性修饰的任何作物。在2015年夏季在爱荷华州中部的田地中进行了实施例1-4。

[0056] 实施例1

[0057] 使用甜玉米杂种实践了本文描述的发明,所述甜玉米杂种对于在成熟时造成皱缩颗粒表型的基因(皱缩或糖样基因座(Jennings, P.H. 和C.L. McCombs, (1969) *Phytochemistry* 8(8):1357-1363)而言是纯合子隐性的,且对于产生白色胚乳的黄色基因座而言是纯合子隐性的(Buckner, B. 等人(1990) *The Plant Cell*, Vol 2, 867-876)。将该甜玉米杂种用作雌性,并在两个36.5米(120英尺)行中培养,不与正常商品谷物玉米植物(黄色胚乳颗粒)分离,并且不造成雄性不育(即没有去雄花穗)。具有白色和非皱缩胚乳特征的雄性存在于十个4.5米(15英尺)行中,所述行平均而言离雌性甜玉米行6米(20英尺)栽培。通过在上午大约8:30在天然花粉脱落阶段的最早部分强制接受来自白色胚乳雄性的雄花穗的花粉(花粉^M)实践本发明。通过将雄花穗装袋和将花粉收集在袋中收集花粉。然后立即将花粉^M使用本领域众所周知的技术手工地引导至甜玉米雌性花丝,所述技术包括在花粉袋上轻敲以将花粉颗粒释放到花丝上。通过使用该方法,皱缩颗粒代表自花授粉的污染颗粒,黄色颗粒代表异型杂交污染物,且白色颗粒代表预期的F1杂交。使用该方法制备了共30,821个颗粒。几个甜玉米雌性不具有向它们引导的花粉^M且被允许开放授粉。从这些开放授粉的穗制备了共28,896个颗粒,并将它们用作对照。

[0058] 表2表明,存在18%的来自自我污染和交叉污染的总污染物下降。这是比预期更低的污染下降,但是仍然代表纯度水平的实质提高。在本实施例的映像(reflection)、分析和靠近检查后,变得显而易见的是,有几个因素限制所述系统达到甚至更低的污染。在该实施例中使用的甜玉米是为了方便而使用,因为它提供容易的标志物来鉴别污染物,但是具有非常大的雄花穗,具有比杂种的平均雌性亲本多5-10倍或更多的花粉。该大量花粉的效应可以如下容易地看到:在用作对照的开放授粉的穗中的自花授粉的高百分比,其在本实施例中为93%,且在下面的实施例2中为96%。对于正常的谷物玉米雌性,以类似的栽培实践,该数字预期是在50-80%范围内。在下面的实施例4中,使用白色谷物雌性,自花授粉百分比仅为78%。影响本实施例的结果的另一个因素是,我们没有尝试在雌性开始脱落花粉之前通过良好授粉来完全实施本发明。我们如下简单地尝试了应用本发明:在天然花粉脱落的最开始进行定向授粉,以尝试竞争胜过污染物。该方案意图简单地表明仅使用部分贯彻方

案的本发明的潜力。最后,限制污染物减少的另一个因素是,来自白色玉米的花粉是来自近亲交配体,且已经被证实与杂交花粉(即甜玉米花粉)相比是低竞争性的。考虑到这些因素,18%污染物下降是合理的纯度水平提高。

[0059] 表2.当用本文描述的发明使用白色雄性时,来自白色甜玉米雌性亲本的自花授粉和异型杂交污染的污染减少。

[0060]

授粉类型	开放授粉		响应需要的发明	
	对照*	总数的百分比	白色甜玉米上的白色	总数的百分比
	-----颗粒的数目-----			
预期的 F1 杂交(白色)	539	2%	7242	23%
自花授粉的污染物(皱缩)	26798	93%	22730	74%
异型杂交污染物(黄色)	1532	5%	849	3%
总计:	28869		30821	
响应需要的污染减少	18%			

[0061] 实施例2.在另一个工作实施例中,使用甜玉米杂种实践本文描述的发明,所述甜玉米杂种对于在成熟时造成皱缩颗粒表型的基因(皱缩或糖样基因座)而言是纯合子隐性的,且对于产生白色胚乳的黄色基因座而言是纯合子隐性的。将该甜玉米杂种用作雌性,并在两个69米(225英尺)行中培养,不与正常商品谷物玉米植物(黄色胚乳)分离,并且不造成雄性不育(即没有去雄花穗)。周围的正常商品谷物玉米植物用作雄性且具有正常胚乳(未皱缩)特征,并且存在于雌性的所有邻近行中。此外,在早晨在约上午8:15将水喷洒在雌性行的雄花穗上以延迟从这些雌性行的花粉脱落直到约上午8:45。将水喷洒在雌性雄花穗(female tassels)上以后,立即通过强制接受来自黄色胚乳雄性的雄花穗的花粉^M(通过将雄花穗装袋和将所述花粉收集在袋中)来实践本发明。然后立即使用本领域众所周知的技术手工地将花粉^M引导至甜玉米雌性花丝,所述技术包括在花粉袋上轻敲以将花粉颗粒释放到花丝上。在这些雌性脱落任何花粉之前,进行该步骤。通过使用该方法,皱缩颗粒代表自花授粉的污染物颗粒,且黄色颗粒代表预期的F1杂交。没有异型杂交污染的测量。使用该方法制备了共34473个颗粒。几个甜玉米雌性不具有引向它们的花粉^M且被允许开放授粉。从这些开放授粉的穗制备了共4914个颗粒,并将它们用作对照。

[0062] 表3表明,存在31%的来自自我污染和交叉污染的总污染物下降。该污染下降是可观的,特别是考虑到本实施例代表的困难原型,因为来自指定雌性植物的雄花穗和花粉脱落是巨大的(比正常雌性杂交亲本多5-10倍或更多)。这些结果反映了如本文中所述的发明的实现,但是可以付出甚至更高的努力以进一步改善结果。如果使用保存的花粉的来源,可

以在早晨更早的时间进行授粉以给预期的花粉提供更多的时间以长出花丝和将雌性的卵受精。

[0063] 表3. 当用本文描述的发明使用黄色雄性时, 来自白色甜玉米雌性亲本的自花授粉的污染减少。

[0064]

授粉类型	开放授粉		响应需要的发明	
	对照*	总数的百分比	在白色甜玉米上的黄色	总数的百分比
	-----颗粒的数目-----			
预期的 F1 杂交(黄色)	192	4%	12837	37%
自花授粉的污染物(皱缩)	4722	96%	21636	63%
异型杂交污染物(没有诊断)	0	0%	0	0%
总计:	4914		34473	
响应需要的污染减少	31%			

[0065] 实施例3. 在该实施例中, 使用纯合的蜡状雌性亲本和在蜡状基因座 (Nelson, O.E. (1968) Genetics 60:507-524) 处含有功能性或野生型等位基因的雄性亲本的混合物模拟本发明。蜡状等位基因是隐性遗传的, 且当它处于纯合状态 (代表自花授粉污染物) 时, 它给颗粒提供特征性的不透明表型, 这是肉眼可容易地识别的。将雌性栽培在三个4.6米 (15英尺) 行中, 没有分离, 且没有使它们雄性不育 (即没有去雄花穗)。雄性存在于雌性行的所有侧面附近且靠近。如下实践本发明: 在大约上午8:30将雄性植物雄花穗装袋并强制接受来自天然花粉脱落阶段的最早部分的雄性的花粉^M, 由此将它收集在袋中。然后立即将花粉^M使用本领域众所周知的技术手工地引导至蜡状雌性花丝, 所述技术包括在花粉袋上轻敲以将花粉颗粒释放在花丝上。存在14个在该实施例中衍生出的穗, 总计3217个颗粒。表4显示了本实施例的结果。尽管在该实验中没有直接包括对照, 来自文献的推测预期是, 在不使用本发明的情况下, 存在来自雌性的自花授粉的50%污染的最小值 (参见, 例如, Paterniani E. 和 Stort, A.C. (1974) Euphytica 23:129-134; Ma, B.L. 等人 (2004) Crop Sci. 44:1273-1282)。通过使用来自下面实施例4的对照, 人们可以预见到不使用本发明时约78%的污染水平。在该实施例中, 自花授粉污染减少至2%。这代表来自自花授粉的污染水平的97%下降。在该实施例中, 可以制备满足标准的95%纯度水平的杂交种子。

[0066] 表4. 当用本文描述的发明使用野生型雄性时, 来自蜡状雌性亲本的自花授粉的污染减少。

[0067]

授粉类型	开放授粉		响应需要的发明	
	对照*	总数的百分比	在蜡状上的野生型	总数的百分比
	-----颗粒的数目-----			
预期的 F1 杂交(玻璃质)	1337	22%	3217	98%
自花授粉的污染物(蜡状)	4724	78%	66	2%
异型杂交污染物(没有诊断)	ND	ND	ND	ND
总计:	6061		3283	
响应需要的污染减少	97%			

[0068] *为蜡状对照使用黄色/白色对照。在相同行中的受控自花授粉的蜡状植物是100%蜡状。

[0069] 实施例4. 使用纯合的白色胚乳雌性(即在黄色基因座处纯合子隐性的(y/y))亲本和黄色胚乳雄性亲本的混合物,进一步模拟本文描述的发明。在2015年夏季在爱荷华州将雌性栽培在田地中的一个4.6米(15英尺)行中,没有分离,且没有使植物雄性不育(即没有去雄花穗)。雄性存在于雌性行的所有侧面附近且靠近。如下实践本发明:在大约上午8:30将雄性雄花穗装袋并强制接受来自天然花粉脱落阶段的最早部分的雄性的花粉^M。然后立即将花粉^M使用本领域众所周知的技术手工地引导至蜡状雌性花丝,所述技术包括在花粉袋上轻敲以将花粉颗粒释放在花丝上。存在5个在该实施例中衍生出的穗,总计888个颗粒。在该行和在其它具有白色胚乳雌性的附近行内存在几株植物,其被允许开放授粉并用作对照,从而构成共6061个颗粒。表5表明,在该实施例中存在污染的79%下降。本实施例可以是这样的情况:其中人们利用胚乳颜色标志物来提高纯度,通过分选出白色胚乳颗粒(即自花授粉)以使纯度达到标准的95%水平。

[0070] 表5. 当用本文描述的发明使用黄色胚乳雄性时,来自白色胚乳雌性亲本的自花授粉的污染减少。

[0071]

授粉类型	开放授粉		响应需要的发明	
	对照*	总数的百分比	在白色上的黄色	总数的百分比
	-----颗粒的数目-----			
预期的 F1 杂交(黄色)	1337	22%	744	84%
自花授粉的污染物(白色)	4724	78%	144	16%
异型杂交污染物(没有诊断)	ND	ND	ND	ND
总颗粒	6061		888	
响应需要的污染减少	79%			

[0072] 实施例5. 以与当前实践完全相同的方式种植玉米种子杂交生产地块,但是将隔离距离减小50%或更多,在降低的水平实践雌性亲本的去雄花穗从而允许10%的雌性具有脱落雄花穗(而不是标准的1%脱落雄花穗),并且将雄性植物的百分比降低50%或更多。收集并保存雄性亲本花粉,且得自贮存设备并在上午6点应用于雌性亲本花丝。

[0073] 预期结果是,当与没有实施本发明的相同生产实践对比时,污染减少了50%或更多。在该实施例中的参数可能适当地应用于这样的杂交种子生产地块:其利用脱落平均量至稍微超过平均量的花粉的雄性,和脱落平均量的花粉的雌性。

[0074] 实施例6. 以与当前实践完全相同的方式种植玉米种子杂交生产地块,包括标准隔离距离和标准去雄花穗实践(以使1%或更少的雌性具有脱落雄花穗),且包括在标准百分比的雄性(基于所述雄性脱落的花粉的量)。例如,假定将雄性确定为“差”雄性且每个雄花穗脱落小于200万个花粉颗粒。在该情况下,有些种子标准将该雄性视作低于标准并抛弃它,不论它产生的杂种的收率可以是如何的高。其它种子可能用该雄性冒险并在杂交种子生产地块中以相对于雌性的高比率种植它。

[0075] 在该实施例中,以2:4比率(每4个雌性行有2个雄性行)种植雄性,围绕整个生产地块具有10行雄性的边界。使用雄性亲本花粉实践本发明,所述雄性亲本花粉已经收集和保存并得自贮存设备和精确地在上午6点应用于雌性亲本花丝。

[0076] 预期结果是,污染可以降低至满足杂交种子的认证和销售标准的水平。在正常生产条件下,在该实施例中描述的生产田地可以是平均5%污染,归因于利用的差雄性。在该平均值附近的范围可以是1-8%污染,这取决于任何给定田地的环境条件(例如风和附近玉米田地的靠近)。这暗示着,一半具有该情形的生产田地生产低于标准的(<95%纯度)杂交种子,其可能需要抛弃。对于已经在其中实施本发明的田地,使用50%的污染下降暗示,平均污染现在将是2.5%,可能范围是从0%至5%。在该情况下,在正态分布下,人们可以预见到在该实施例中90-100%的生产田地生产满足95%标准的种子。

[0077] 实施例7.玉米亲本种子生产田地是一块分离的田地(201米(660英尺)或更大),其含有给定杂种的仅一种亲本。允许所述亲本开放授粉或基本上自花授粉,以增加它的种子,使得存在足够的亲本种子以在杂交种子生产中使用所述亲本。几代亲本种子增加是必要的,以产生足够的亲本种子从而在杂交种子生产地块中最终使用所述亲本。

[0078] 在该亲本种子生产实施例中,没有与其它潜在污染玉米分离。使用所述亲本的花粉实践本发明,所述花粉已经收集和保存并且得自贮存设备和在上午6点应用于亲本的花丝。预期的结果是,当与没有实施本发明的相同生产实践对比时,污染减少了50%或更多。当不可能达到隔离距离时,可能应用在该实施例中的参数,且仍然需要增加亲本以制备重要产品的杂交种子。当种子公司尝试为即将到来的生长季节增加亲本时,在相反季节生长地方(例如夏威夷)可以遇到该情形。

[0079] 工作实施例的总结.实施例1-4举例说明了本发明可以如何工作至不同的成功水平,这取决于指定的雄性和雌性的雄性特征。在这些实施例的所有四个中,尽管使用本发明的模拟或使用本发明本身观察到污染的减少,但是理想的是利用保存的花粉,其可响应需要得到以例证本发明的实用性和潜力。这已经允许在更理想的时间将花粉应用于花丝,其能避免与天然花粉云的所有竞争,并且将具有这样大的沿着靶花丝向下生长的头起点,使得将雌性受精的其它污染花粉的可能性极大地减小,从而将污染百分比降低至甚至比这些实施例更低的水平。

[0080] 尽管在上面已经以某种详细程度描述了本发明的不同代表性实施方案,但是本领域技术人员可以对公开的实施方案做出众多改变,而不脱离在说明书和权利要求书中阐述的本发明的主题的精神或范围。在某些情况下,在本文直接地或间接地阐述的方法中,以一种可能的操作次序描述了各个步骤和操作,但是本领域技术人员会认识到,可以将步骤和操作重新排列、替换或消除,而不一定脱离本发明的精神和范围。在以上描述中所含的或在附图中表明的所有内容意图解释为仅仅示例性的和非限制性的。可以做出细节或结构的变化,而不脱离在所附权利要求书中定义的本发明的精神。

[0081] 尽管已经参考上述实施方案描述了本发明,但是至少具有本领域的普通技术的人员会明白各种替代方案、修改、变化、改进和/或实质等同方案(无论已知的还是当前能够或可能预见到的)。以某种次序列出方法的步骤不会构成对方法步骤的次序的任何限制。因此,上述的本发明的实施方案意图是示例性的,不是限制性的。本领域技术人员会认识到,可以在形式和细节中做出变化,而不脱离本发明的精神和范围。因此,本发明意图包括所有已知的或较早开发的替代方案、修改、变化、改进和/或实质等同方案。

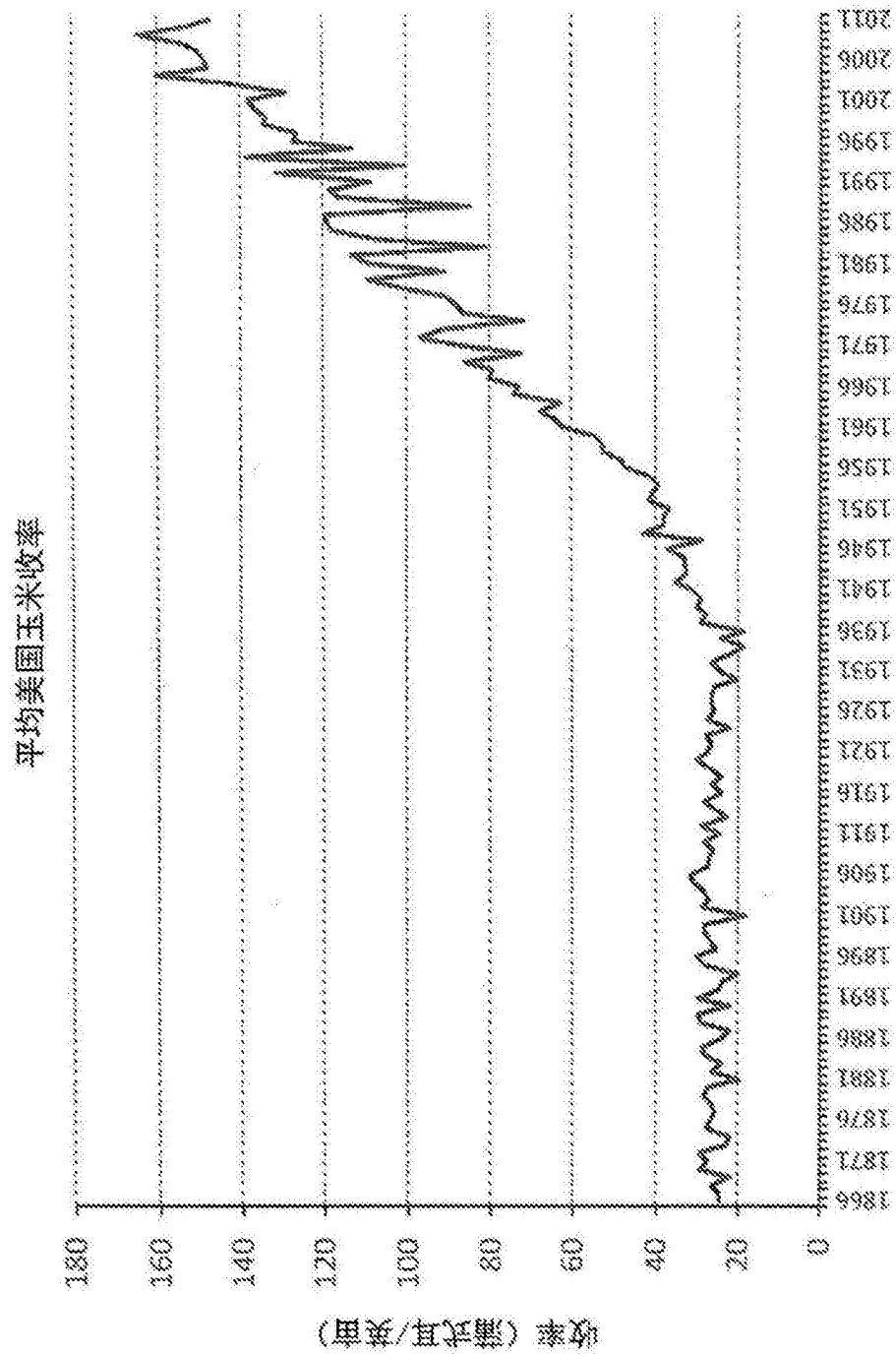


图1

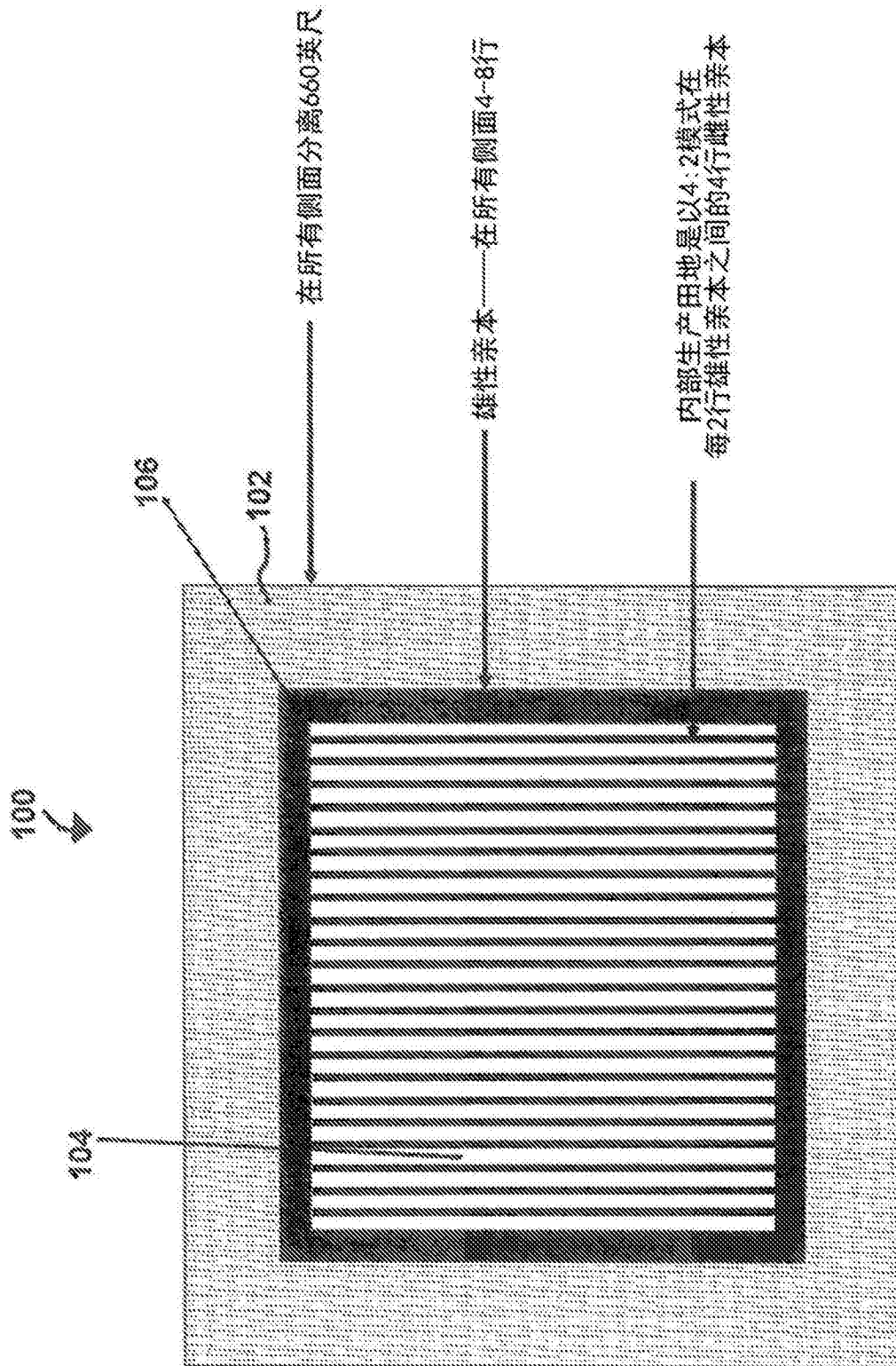


图2