



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103340145 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201310302454. X

(22) 申请日 2013. 07. 15

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 陈绍江 吴鹏昊 任姣姣

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

A01H 1/02(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1843092 A, 2006. 10. 11, 说明书第 2 页第 4-8 段, 第 1 页第 2 段, 说明书第 3 页第 3 段。

CN 1843092 A, 2006. 10. 11, 说明书第 2 页第 4-8 段, 第 1 页第 2 段, 说明书第 3 页第 3 段。

CN 102217530 A, 2011. 10. 19, 全文。

WO 2007103786 A2, 2007. 09. 13, 全文。

吴鹏昊等. 玉米单倍体中产生的 BH, DH 和 EH 群体性状比较. 《2012 年全国玉米遗传育种学术研讨会暨新品种展示观摩会论文及摘要集》. 2012, 第 76 页.

审查员 王涛

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种利用玉米单倍体育种进行一步成系的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种玉米单倍体育种进行一步成系的方法。所述方法具体为一种获得玉米加倍单倍体的方法, 包括如下步骤: 以玉米 A 为父本、玉米 B 为母本进行杂交, 从获得的 F1 代中选择由母本孤雌生殖发育而来的、且发生了自然加倍的籽粒或植株即所述玉米加倍单倍体。所述玉米 A 为玉米孤雌生殖诱导系, 所述玉米 B 为玉米杂交种或玉米自交系。本发明方法得到的加倍单倍体可作为玉米自交系直接进入玉米育种环节, 免去了以往只选择 F1 代单倍体表型植株由于其结实能力差而进行加代繁种的步骤, 可一步成系, 具有高效、低毒、投入成本低、等优点。

1. 一种获得玉米加倍单倍体的方法,包括如下步骤:以玉米 A 为父本、玉米 B 为母本进行杂交,从获得的 F1 代中选择由母本孤雌生殖发育而来的、且发生了自然加倍的植株即所述玉米加倍单倍体;

所述玉米 A 为玉米孤雌生殖诱导系,所述玉米 B 为玉米杂交种或玉米自交系;

所述从获得的 F1 代中选择由母本孤雌生殖发育而来的、且发生了自然加倍的植株的方法包括如下步骤:

从获得的 F1 代中选择具有二倍体表型、但不具有杂种优势表型和单倍体表型以及不具有父本特征性状的植株;所述父本特征性状为所述母本不具有的性状或基因;

所述杂种优势表型表现为株高和穗位高均大于所述父本和所述母本;所述二倍体表型表现为株高和穗位高与所述父本和 / 或所述母本无显著差异;所述单倍体表型表现为叶片上冲、窄小,株高和穗位高都显著低于所述父本和 / 或所述母本。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述 F1 代中具有二倍体表型植株的散粉率、自交结实粒数、自交结实率、穗粗和穗长均高于具有单倍体表型植株。

3. 一种玉米自交系选育的方法,包括从权利要求 1 或 2 所述方法获得的玉米加倍单倍体的自交 1 代中选择具有目标性状的纯系获得玉米自交系。

4. 权利要求 1-3 中任一所述方法及其获得的玉米加倍单倍体或玉米自交系在玉米育种中的应用。

一种利用玉米单倍体育种进行一步成系的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及玉米遗传育种领域,具体涉及一种获得玉米加倍单倍体的方法。

背景技术

[0002] 杂交种是玉米利用杂种优势的形式,玉米育种过程中通过选育玉米自交系进而组配杂交种达到利用杂种优势的目的。玉米自交系的培育须经过多代的自交和选择,通常选育玉米自交系需要连续自交多代多年才能在遗传上接近纯合,需要消耗大量的人力、物力和财力。如何缩短育种进程、提高育种效率是育种家一直追求的目标。玉米单倍体是配子体无融合生殖的产物,包括孤雄生殖和孤雌生殖两大类。对获得的单倍体进行加倍,只需要一个世代就可以获得纯和二倍体,大大缩短了育种时间。

[0003] 现代玉米单倍体育种广泛使用高频孤雌生殖诱导系作父本,与普通玉米材料杂交,杂交当代果穗上即可获得一定比例的由母本孤雌生殖发育而来的籽粒。目前,通常认为这些由母本孤雌生殖发育所得籽粒的胚为单倍体,由其长成的植株一般具有叶片上冲长势弱、高度不育等特点,需要经过种植进行自然或化学加倍才能获得加倍单倍体(Doubled Haploid)即DH系,加倍当代一般果穗小、自交结实率低;为了进一步利用该DH系进行育种,还需要至少一代的自交扩繁。而如果早期的田间植株具有长势良好的二倍体表型,就会被认为是杂交种而直接去除。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种利用玉米单倍体育种进行一步成系的方法,具体为一种获得玉米加倍单倍体的方法,包括如下步骤:以玉米A为父本、玉米B为母本进行杂交,从获得的F1代中选择由母本孤雌生殖发育而来的、且发生了自然加倍的籽粒或植株即所述玉米加倍单倍体。

[0005] 在上述方法中,所述玉米A为玉米孤雌生殖诱导系,具体可为农大高诱1号或农大高诱5号;

[0006] 所述玉米B为玉米杂交种或玉米自交系,具体可为郑单958、郑58、昌7-2、87-1、4F1、齐319、BY815、许178、B73或丹598。

[0007] 在上述方法中,所述从获得的F1代中选择由母本孤雌生殖发育而来的、且发生了自然加倍的籽粒或植株的方法包括如下步骤:

[0008] 从获得的F1代中选择具有二倍体表型、但不具有杂种优势表型和单倍体表型的籽粒和/或植株,以及胚不具有父本特征性状的籽粒且不具有父本特征性状的植株。所述父本特征性状为所述母本不具有的性状或基因。

[0009] 在上述方法中,所述杂种优势表型表现为株高和穗位高均大于所述父本和所述母本;所述二倍体表型表现为株高和穗位高与所述父本和/或所述母本无显著差异;所述单倍体表型表现为叶片上冲、窄小,株高和穗位高都显著低于所述父本和/或所述母本。

[0010] 在上述方法中,所述F1代中具有二倍体表型植株的散粉率、自交结实粒数、自交

结实率、穗粗和穗长均高于具有单倍体表型植株。

[0011] 本发明还提供一种玉米自交系选育的方法,包括从上述任一所述方法获得的玉米加倍单倍体的自交 1 代中选择具有目标性状的纯系获得玉米自交系。

[0012] 本发明保护任一所述方法及其获得的玉米加倍单倍体或玉米自交系在玉米育种中的应用。所述玉米育种包括选育玉米纯系选择、配制玉米杂交组合、种子生产等步骤。

[0013] 实验证明,由母本孤雌生殖发育所得籽粒的胚及其长成的植株不全都为单倍体,有的为加倍单倍体,具有正常二倍体的表型、但不具有杂种优势、单倍体表型和父本特征性状,其散粉率、自交结实数、穗粗和穗长均高于具有单倍体表型植株,且自交后代表型一致。本发明方法得到的加倍单倍体可作为玉米自交系直接进入玉米育种环节,免去了以往只选择 F1 代单倍体表型植株由于其结实能力差而进行加代繁种的步骤,可一步成系,具有高效、低毒、投入成本低、等优点。

具体实施方式

[0014] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0015] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0016] 下述实施例中所用的玉米自交系的信息如下:

[0017] 郑 58 :张发林. 玉米优良自交系郑 58 的育成和应用. 作物杂志. 2001, (4).

[0018] 昌 7-2 :崔俊明. 玉米自交系昌 7-2. 玉米科学. 2010 年第三期.

[0019] 87-1 和丹 598 :刘文国. 78599 系列自交系在吉林省玉米育种中的优缺点及对策. 吉林农业科学. 2003, 28(1):18-19.

[0020] 齐 319 :叶金才. 育成我国首例对玉米南方锈病免疫系齐 319. 中国农业科学. 2000 年第 4 期.

[0021] 许 178 :毛克举. 玉米自交系许 178 背景的综 3 染色体单片段代换系的构建. 河南农业大学学报. 2013 年第 1 期.

[0022] BY815 :张洋等. 高油玉米自交系产量性状的配合力及聚类分析. 玉米科学. 2006, 14 (3):25-29.

[0023] B73:汪结明等. 玉米自交系 B73 全基因组 NBS 类型抗病基因分析. 作物学报. 2009, 35(3):566-570.

[0024] 农大高诱 1 号 :刘志增, 宋同明. 玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定 [J]. 作物学报, 2000, 26(5):570-574.

[0025] 农大高诱 5 号 :黎亮. 玉米单倍体育种技术研究及单倍体诱导性状的遗传与生物学机理探讨:[博士学位论文]. 北京:中国农业大学, 2010.

[0026] 以上玉米自交系材料公众可从中国农业大学获得。

[0027] 实施例 1、筛选获得高结实率玉米加倍单倍体的方法

[0028] 一、玉米单倍体籽粒的获得

[0029] 母本:玉米杂交种郑单 958 (北京德农种业有限公司)、郑单 958 的亲本自交系郑 58 或昌 7-2、以及代表不同杂种优势群的其他玉米自交系 87-1, 4F1, 齐 319, BY815, 许 178, B73 或丹 598 ;

[0030] 父本:孤雌生殖单倍体诱导系农大高诱 1 号或农大高诱 5 号。

[0031] 按照表 1 所示的 11 种杂交组合,将上述父本与母本杂交,基于父本的 Navajo 遗传标记系统,以籽粒的紫顶(即糊粉层为紫色)和紫胚为显性标记,对杂交 F1 代籽粒逐粒鉴定,去除胚中含有父本特征性状的籽粒,即紫顶紫胚的籽粒(正常杂交的二倍体)、白顶白胚的籽粒(受花粉污染的二倍体),以及无胚籽粒,保留紫顶白胚的籽粒(母本孤雌生殖发育而来的单倍体或加倍单倍体)。

[0032] 二、玉米单倍体籽粒的田间种植

[0033] 将步骤一获得的所有 F1 代紫顶白胚的籽粒种植在中国农业大学上庄试验站,种植密度为 6000 株/亩,田间精细管理,确保幼苗正常生长,并随时去除含有父本特征性状的植株:即叶片为紫色的植株,以及自交结实果穗中籽粒含有紫色糊粉层和/或紫胚的植株。

[0034] 三、田间表型筛选母本孤雌生殖发育而来的单倍体和加倍单倍体

[0035] 将步骤二的植株按各杂交组合内的田间表型分成三类,A 类为具有二倍体表型的植株,表现为株高和穗位高与所述父本和/或所述母本无显著差异;B 类为具有单倍体表型的植株,表现为叶片上冲、窄小,株高和穗位高都显著低于所述父本和/或所述母本;C 类为具有杂种优势表型的植株,表现为株高和穗位高均大于所述父本和所述母本,且生活力很强,长势很旺、散粉时期较早。去除所有 C 类植株。

[0036] 为了进一步保证 A 类植株为加倍单倍体,而不是单倍体,还随机从各杂交组合的该类单株中取 6 片至 7 片叶时期的根尖进行细胞学鉴定观察染色体数目,取 6 片叶至抽雄之前的叶片用流式细胞仪检测细胞中的 DNA 含量,结果 A 类植株全部为二倍体植株。

[0037] 四、自交并收获果穗

[0038] 对步骤三的 B 类植株和 A 类植株中散粉特征良好(即雄穗全部可育)的植株(即加倍单倍体植株)严格自交,并按单株收获果穗。

[0039] 五、数据统计和结果

[0040] 每个杂交组合设 2 个重复,统计每个重复 F1 代籽粒中紫顶白胚的籽粒数,计算紫顶白胚的籽粒数占 F1 代籽粒总数的百分比,即单倍体诱导率(%);统计田间散粉植株数占总植株数的百分比,即单倍体加倍率(%);统计 B 类植株和 A 类植株;计算 B 类植株中雄穗散粉率和 A 类植株的散粉率(单倍体雌穗恢复二倍化的程度大大高于雄穗,单倍体能否自交结实主要取决于雄穗是否产生花粉)。结果如表 1 所示。

[0041] 统计 B 类植株和 A 类植株的单株结实率(即单株结实粒数占单株胚囊总数的百分比)、穗粗和穗长,各重复内结果的平均值±标准差及变异范围的结果如表 2 所示。

[0042] 表 1、不同杂交组合两类植株单倍体加倍效率

[0043]

杂交组合 (母×父)	紫顶白胚 籽粒数	单倍体诱导 率 (%)	A 类植株		B 类植株	
			数目	散粉率 (%)	数目	散粉率 (%)
郑单 958×农 大高诱 5 号	511	9.76%	14	100%	67	14.14
	346	10.12%	9	100%	77	25.58
郑单 958×农 大高诱 1 号	712	1.99	20	100%	86	13.15
	227	2.07	6	100%	54	26.43
87-1×农大高 诱 1 号	157	1.69	3	100%	112	85.99
	185	1.99	4	100%	147	88.65
4F1×农大高 诱 1 号	186	2.51	2	100%	112	69.35
	162	2.69	2	100%	104	74.69
郑 58×农大 高诱 1 号	190	3.11	4	100%	13	8.95
	127	3.17	3	100%	7	9.49
昌 7-2×农大 高诱 1 号	190	1.45	7	100%	12	7.95
	260	1.55	10	100%	66	30.09
许 178×农大 高诱 1 号	135	2.01	3	100%	62	58.51
	146	2.06	2	100%	110	81.51
齐 319×农大 高诱 1 号	125	2.07	3	100%	109	92.2
	133	2.11	2	100%	41	76.69
BY815×农大 高诱 1 号	215	2.22	3	100%	70	36.28
	223	2.16	3	100%	43	24.22
B73×农大高 诱 1 号	310	2.76	4	100%	19	8.41
	202	2.81	3	100%	71	40.1
丹 598×农大 高诱 1 号	189	3.88	2	100%	38	24.87
	137	3.91	2	100%	0	0

[0044] 表 2、不同杂交组合两类植株果穗特征数据

[0045]

杂交组合 (母×父)	植 株 类 别	单株结实粒数		单株结实率 (%)		穗粗 (cm)		穗长 (cm)	
		平均值 ±标准 差	变异范 围	平均值 ±标准 差	变异范 围	平均值±标 准差	变异范围	平均值 ±标准 差	变异范 围
郑单 958 ×农大高 诱 5 号	B	7.4±1. 17a	0-11	1.77± 0.44a	0-4.09	1.45±0.27 a	1.12-1.77	6.57±1 .69a	2.55-9. 34
	A	244±1. 33b	177-27 8	96.3± 0.24b	86.33- 97.14	3.78±0.26 b	2.91-4.44	15.01± 1.49b	11.43-1 7.45
郑单 958 ×农大高	B	6.9±1. 09a	0-9	1.69± 0.33a	0-3.23	1.37±0.22 a	1.23-1.77	6.57±1 .69a	5.55-8. 34

[0046]

诱1号	A	227±1.81b	145-269	94.45±0.67b	91.22-100	3.78±0.26b	2.91-4.44	15.01±1.49b	11.43-17.45
87-1×农大高诱1号	B	12.17±0.89a	3-26	4.68±0.03a	0-10.65	2.62±0.27a	2.38-2.95	9.03±1.65a	7.53-11.50
	A	298±0.32b	271-349	95.2±0.07b	85.69-99.29	4.63±0.17b	4.51-4.89	12.00±1.35b	11.08-14.00
4F1×农大高诱1号	B	3.58±2.31a	0-9	1.30±0.01a	0-5.11	1.63±0.36a	1.08-1.95	12.76±2.07a	9.86-14.56
	A	249.8±3.19b	208-288	96.82±0.02b	94.55-100	3.71±0.29b	3.32-4.10	15.4±1.55b	13.88-17.17
郑58×农大高诱1号	B	5.91±0.39a	0-14	2.48±0.02a	0-7.29	1.62±0.37a	1.32-2.34	8.95±0.29a	4.77-10.51
	A	210±0.85b	130-288	93.38±0.07b	83.33-100	3.88±0.19b	3.71-4.06	14.5±0.13b	13.00-16.14
昌7-2×农大高诱1号	B	2.82±2.09a	0-7	1.26±0.01a	0-2.98	1.51.35±0.33a	1.14-1.95	5.70±1.24a	4.11-7.87
	A	265±0.64b	192-351	96.85±0.05b	91.90-100	4.14±0.41b	3.71-4.84	10.06±0.63b	9.09-11.09
许178×农大高诱1号	B	2.91±0.39a	0-17	2.16±0.02a	0-6.29	1.42±0.51a	1.12-2.34	7.19±0.36a	4.87-11.51
	A	222±0.95b	176-234	95.58±0.07b	93.33-100	3.59±0.17b	3.13-4.78	12.5±0.16b	10.19-17.54
齐319×农大高诱1号	B	2.34±1.09a	0-5	1.26±0.01a	0-2.78	1.46±0.73a	1.14-1.95	5.70±1.24a	4.11-7.87
	A	279±0.54b	233-343	92.67±0.15b	90.59-100	3.91±0.24b	3.41-5.84	12.06±0.76b	8.09-16.06
BY815×农大高诱1号	B	8.91±0.79a	0-25	2.25±0.03a	0-13.54	1.74±0.51a	1.43-2.25	10.39±0.71a	9.07-11.25
	A	222±0.21b	179-246	97.52±0.02b	93.11-99.77	4.32±0.19b	4.05-4.98	11.5±0.11b	10.86-11.99
B73×农大高诱1号	B	17.91±1.26a	5-44	6.40±0.57a	1.07-20.83	2.18±0.33a	1.95-2.53	8.55±0.76a	7.54-10.22
	A	365±0.88b	285-477	99.48±0.03b	99.24-100	4.30±0.19b	4.16-4.58	11.63±0.16b	10.54-14.12
丹598×农大高诱1号	B	2.76±0.77a	0-4	1.25±0.03a	0-3.54	2.44±0.53a	2.13-3.25	7.31±0.71a	4.07-10.95
	A	266±0.19b	176-246	92.25±0.02b	87.12-96.77	5.32±0.39b	4.05-5.98	9.5±0.11b	7.86-11.61

[0047] 注：同一杂交组合同一统计项目下两类不同植株的结果间比较后，若在 $P < 0.05$ 差异显著，则在结果后标记不同的小写字母 a 或 b。

[0048] 表 1 和表 2 的结果表明，A 类植株散粉率都能够达到 100%，高于 B 类植株的散粉率。A 类植株的单穗结实籽粒数在 100 粒以上，远高于 B 类植株不到 10 粒的结果，A 类植株

的单株结实率是 B 类植株的 10 倍。A 类植株的穗部性状也要显著优于 B 类植株。

[0049] 六、加倍单倍体自交一代植株群体的表型一致性鉴定

[0050] 将表 1 所示各杂交组合中 A 类植株的籽粒种植于大田, 每个单穗种一行, 每行 11 粒, 在各生长发育时期观察株行内植株的表型一致性, 结果, 全部整齐一致。说明 A 类植株为由母本孤雌生殖得到的单倍体经加倍后得到的纯系, 该纯系可直接用于玉米育种。

[0051] 实施例 1 的结果证明, 孤雌生殖诱导的籽粒长成的二倍体表型植株中存在加倍单倍体, 且该加倍单倍体具有与一般自交系相近的结实特性, 能够使得到的纯系直接进入育种实践, 免去了单倍体表型植株由于结实能力差而进行加代繁种步骤。