



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108739364 B

(45)授权公告日 2020.09.04

(21)申请号 201810654373.9

(22)申请日 2018.06.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108739364 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(73)专利权人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市学府路301号

(72)发明人 蒋建雄 武艳芳 王永丽 李霞

高璐

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所(普

通合伙) 43114

代理人 袁靖

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

(56)对比文件

丁力等.芒种内F1杂交种的配制及杂种真实性的分子鉴定.《中国草地学报》.2015,第37卷(第2期),第53-57、80页.

审查员 李永超

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法

(57)摘要

本发明属于农业植物育种领域,公开了一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,包括如下步骤:1、材料准备:将芒草幼苗或根状茎盆栽。2、植株培养:盆栽芒草采用24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时培养,每天浇一次透水,每周补充三次Hoagland植物营养液。3、植株修剪:开花期每天及时剪掉已经开花完毕的分蘖,促使植株不断抽生新分蘖并抽穗开花,开花完毕后再剪掉,如此循环,植株即可周年抽穗开花。4、暗诱导花序小穗散粉:选取即将进入扬花盛期的花序进行整理后,植株在室温、完全黑暗条件下诱导8-12小时。5、花粉收集:暗诱导处理后,花序上大部分小穗露出花药,抖动花序收集花粉。该方法简便高效,有利于提高芒草杂交育种及遗传学研究的效率。

1. 一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

1) 用父本和母本自交不亲和性禾本科植物种子发芽,待幼苗在育苗床上生长至20-30 cm高时或者带2-3个健壮芽头的根状茎,单株移栽于盆栽容器中;

2) 等待父本分蘖抽穗开花,收集花粉,进行人工授粉杂交制种;

3) 及时将花序已经散粉完毕的生殖分蘖枝从基部清除,促使植株根状茎上的幼芽不断从基部抽生出来,形成新的分蘖;

4) 重复步骤2);

步骤3) 和4) 至少依次操作一次;

对即将进入扬花盛期的父本暗处理诱导后收集花粉;暗处理是在22℃~25℃诱导处理8-12小时;

盆栽的植株幼苗在开花期之前的培育过程:放置于温室内,在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养三个月,每天浇一次透水,每周补充三次Hoagland植物营养液,并做好蚜虫防治,等待分蘖抽穗开花,收集花粉,进行人工授粉杂交制种;

所述的自交不亲和性禾本科植物为芒草。

2. 根据权利要求1所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,其特征在于,将暗处理诱导后的植株取出,观察到花序上50%以上小穗的两个花药已经分别从内外稃的两侧伸出小穗,然后轻轻抖动花序使花药开裂释放出花粉,收集花粉。

3. 根据权利要求1所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,其特征在于,芒草包含了芒、五节芒、荻或南荻。

## 一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于农业植物育种领域,具体涉及一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法。

### 背景技术

[0002] 芒草(Miscanthus)是一类重要的多年生C4类禾本科能源草和饲草,具有生物质产量高、适应性广、抗逆性强等特点,自然分布于东亚及东南亚地区,其中分布于我国的芒草种类主要有芒(M.sinensis)、五节芒(M.floridulus)、荻(M.sacchariflorus)、南荻(M.lutarioriparius)等。芒草植株通常有几十至上百个分蘖,每个分蘖均具有一个顶生的大型圆锥花序,长度为15-40厘米。

[0003] 自然生长状态下,芒草植株每年只有一个开花期,不同种类的芒草的开花期差别较大,五节芒开花期为5月中旬至8月中旬,芒为6月至11月,荻为5月中旬至9月中旬,南荻为8月至10月,而且同一种类芒草中不同基因型之间的开花时期差别也较大。另一方面,同一芒草植株上不同生殖分蘖枝的抽穗开花不是同步的,整个植株的开花时间一般可维持7-10天,同一圆锥花序上不同部位的小穗开花散粉也是渐进式的,位于花序中上部的小穗最先成熟并释放出花粉,然后往花序的上、下两末端逐批开花,直至花序上全部小穗散粉完毕,整个花序上所有小穗完成开花散粉大约需要5-7天时间,由此可见,芒草植株在开花期间每天开放的小穗数量以及释放的花粉数量非常有限,因此,有性杂交中经常遇到父母本开花授粉期不相遇的难题,大大影响了杂交制种产量和效率,无法满足开展相关遗传学研究或生产上规模化杂交制种的要求,是制约芒草杂交育种以及遗传学研究开展的瓶颈之一。

[0004] 在作物杂交育种中,克服开花期不相遇的方法主要有收集和离体保存父本花粉,但我们的研究表明,芒草离体花粉的生活力只能维持30分钟左右,较长时间离体保存的难度极大。因此发明一种简便、高效的诱导促进芒草植株集中开花和散粉的方法对于提高芒草杂交制种效率,以及遗传育种研究的效率具有十分重要的价值。

[0005] 很多具有自交不亲和性的禾本科植物生长特点也和芒草类似,即分蘖多、抽穗开花不同步、父母本开花授粉期经常不相遇。因此,也存在上述芒草在杂交制种上的问题,可以采用相似的方法解决。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法。该方法操作简单,效率高,可以实现自交不亲和性禾本科植物周年开花,有利于促进自交不亲和性禾本科植物有性杂交育种以及遗传学研究的开展。

[0007] 本发明的目的是通下述方式实现的:

[0008] 一种提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,该方法包括如下步骤:

[0009] 1) 待父本植株的分蘖抽穗开花,收集花粉,进行人工授粉杂交制种;

[0010] 2) 及时将花序已经散粉完毕的生殖分蘖枝从基部清除,促使植株根状茎上的幼芽

不断从基部抽生出来,形成新的分蘖;

[0011] 3) 重复步骤1);

[0012] 步骤2) 和3) 至少依次操作一次。

[0013] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,即将进入扬花盛期的父本暗处理诱导后收集花粉。如果花序上有少量已经开放的小穗,暗处理前先用枝剪清除。

[0014] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,暗处理是在22℃~25℃诱导处理8-12小时。

[0015] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,该方法操作的环境均在条件能控制的温室,每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液。培养条件是在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养。

[0016] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,将暗处理诱导后的植株取出,观察到花序上50%以上小穗的两个花药已经分别从内外稃的两侧伸出小穗,然后轻轻抖动花序使花药开裂释放出花粉,收集花粉。

[0017] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,用父本和母本自交不亲和性禾本科植物种子发芽,待幼苗在育苗床上生长至20-30cm高时或者带2-3个健壮芽头的根状茎,单株移栽于盆栽容器中,等待分蘖抽穗开花,收集花粉,进行人工授粉杂交制种。

[0018] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,盆栽的植株幼苗在开花期之前的培育过程:放置于温室内,在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养三个月,每天浇一次透水,每周补充三次Hoagland植物营养液,并做好蚜虫防治,等待分蘖抽穗开花,收集花粉,进行人工授粉杂交制种。

[0019] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,所述的自交不亲和性禾本科植物包括芒草、柳枝稷、多年生黑麦草、羊草、天蓝鸚草、多花黑麦草、黑麦、球茎大麦、草甸羊茅或大穗看麦娘。

[0020] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,所述的自交不亲和性禾本科植物包括芒草。

[0021] 所述的提高自交不亲和性禾本科植物杂交制种效率的方法,芒草包含了芒、五节芒、荻或南荻。

[0022] 本发明方法优选以下操作方式:

[0023] 1、材料准备:选取高度为20-30cm的芒草幼苗或者带2-3个健壮芽头的根状茎,移栽于加厚的中号塑料花盆中,栽培基质为营养土。

[0024] 2、植株培养:盆栽的芒草植株放置于智能温室内,在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养,每天浇一次透水,每周补充三次Hoagland植物营养液,并做好蚜虫防治。

[0025] 3、植株修剪:芒草植株生长发育成熟进入开花期之后,每天定时检查植株,单个分蘖枝上的花序开花散粉完毕后立即进行修剪,及时用枝剪从分蘖枝基部切断并清理干净,每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液。

[0026] 4、黑暗诱导处理:从植株上选取进入盛花期的花序,用枝剪清除花序上已经开放的少量小穗,然后将植株转移到暗室中,在22℃~25℃、完全黑暗的条件下诱导8-12小时。

[0027] 5、花粉收集:将暗诱导处理后的植株取出,此时可观察到花序上50%以上小穗的

两个花药已经分别从内外稃的两侧伸出小穗,然后轻轻抖动花序使花药开裂释放出花粉,用一个玻璃培养皿等器皿接在花序下方,收集花粉并及时给母本授粉。

[0028] 本发明优势:

[0029] 1、由于芒草的有性杂交中父母本开花授粉期不相遇导致的杂交制种效率低的问题一直困扰着本领域技术人员,大大影响了杂交制种产量和效率,无法满足开展相关遗传学研究或生产上规模化杂交制种的要求,是制约芒草杂交育种以及遗传学研究开展的瓶颈之一,本发明很好的解决了这个问题。

[0030] 2、可以实现芒草周年开花。植物开花期的大幅度延长,有利于促进人工杂交的成功以及增加杂交种子的产量,提高植物遗传育种研究的效率。

[0031] 3、很多具有自交不亲和性的禾本科植物生长特点也和芒草类似,即分蘖多,抽穗开花不同步、父母本开花授粉期经常不相遇。因此,也存在上述芒草在杂交制种上的问题,可以采用相似的方法解决。因此,本发明方法应用前景广泛。

[0032] 4、本发明方法操作简便,成本低,效果突出。

## 附图说明

[0033] 图1为在智能温室内培养的芒草植株;

[0034] 图2为芒草花序经暗诱导后大部分小穗已经露出花药;

[0035] 图3为收集得到的芒草花粉。

## 具体实施方式

[0036] 以下结合实施例进一步说明本发明,而不是限制本发明。

[0037] 实施例1

[0038] 植物材料:芒基因型Ms03(种内杂交的母本)与Ms22(父本)。

[0039] 1、材料准备:用芒Ms03及Ms22种子发芽,待幼苗在育苗床上生长至20-30cm高时,单株移栽于加厚的中号塑料花盆中,所用的栽培基质为营养土。

[0040] 2、植株培养:将盆栽的芒草幼苗放置于智能温室内,在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养约三个月,每天浇一次透水,每周补充三次Hoagland植物营养液,并做好蚜虫防治。

[0041] 3、植株修剪:芒草植株进入开花期后,每天定时检查植株,及时用枝剪将那些花序已经散粉完毕的生殖分蘖枝从基部切断并清理干净,每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液,促使根状茎上的幼芽不断从基部抽生出来,形成新的分蘖,发育成熟然后抽穗开花,开花完毕后再修剪掉,如此循环往复,即可实现芒草植株周年抽穗开花。

[0042] 4、黑暗诱导处理:每次修剪前,分别从Ms03和Ms22植株上选取即将进入盛花期的花序,清除花序上已经开放的少量小穗,然后将植株转移到暗室中,22℃~25℃、完全黑暗的条件下诱导处理8-12小时。

[0043] 5、花粉收集:将暗诱导处理后的植株取出,此时花序上50%以上小穗的两个花药已经伸出小穗,轻轻抖动基因型Ms22的花序使花药开裂释放出花粉,用培养皿等器具接在花序下方收集花粉,剪除收集花粉后的分蘖。

[0044] 6、杂交授粉：立即用收集到的Ms22花粉给Ms03花序上的雌蕊柱头人工授粉，然后将花序套袋留种。

[0045] 7、结实率统计：种子成熟期，从Ms03花序上随机选取200个小穗，统计其结实率，结实率 = (种子数/200) × 100%，重复3次。统计结果表明，芒Ms03(母本)与Ms22(父本)种内杂变的平均结实率达到了82.7% ± 6.4%。

[0046] 实施例2

[0047] 植物材料：芒基因型Ms03(种间杂交的母本)与南荻M132(父本)。

[0048] 1、材料准备：从基因型Ms03或M132植株上选取带2-3个健壮芽头的根状茎，移栽于加厚的中号塑料花盆中，所用的栽培基质为营养土。

[0049] 2、植株培养：将盆栽的芒草根状茎放置于智能温室内，在24℃、光照16小时/18℃、黑暗8小时条件下变温培养约三个月，每天浇一次透水，每周补充三次Hoagland植物营养液，并做好蚜虫防治。

[0050] 3、植株修剪：植株进入开花期后，每天定时检查植株，及时用枝剪将那些花序已经散粉完毕的生殖分蘖枝从基部切断并清理干净，每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液，促使根状茎上的幼芽不断从基部抽生出来，形成新的分蘖，发育成熟然后抽穗开花，开花完毕后再修剪掉，如此循环往复，即可实现芒草植株周年抽穗开花。

[0051] 4、黑暗诱导处理：每次修剪前，分别从Ms03和M132植株上选取即将进入盛花期的花序，清除花序上已经开放的少量小穗，然后将植株转移到暗室中，在22℃~25℃、完全黑暗的条件下诱导处理8-12小时。

[0052] 5、花粉收集：将暗诱导处理后的植株取出，此时花序上超过50%小穗的两个花药已经伸出小穗，轻轻抖动基因型M132的花序使花药开裂释放出花粉，用培养皿等器具接在花序下方收集花粉，剪除收集花粉后的分蘖。

[0053] 6、杂交授粉：立即用收集到的M132花粉给Ms03花序上的雌蕊柱头人工授粉，然后将花序套袋留种。

[0054] 7、结实率统计：种子成熟期，从Ms03花序上随机选取200个小穗，统计其结实率，结实率 = (种子数/200) × 100%，重复3次。统计结果表明，芒Ms03(母本)与M132(父本)种间远缘杂变的平均结实率为46.5% ± 7.0%。

[0055] 对比例1

[0056] 植物材料：芒基因型，编号为Ms344和Ms420，种植于江苏大学实验圃内，两者的自然开花期相近，在9月下旬至10月中旬。

[0057] 1、花序套袋：从进入盛花期的母本植株上选取小穗尚未开放的花序，用硫酸纸袋套袋并封口，然后编号。

[0058] 2、人工杂交：每天清晨定期检查母本植株上套袋花序的发育状态，套袋花序即将进入扬花盛期时，再在父本植株上寻找是否有已处于扬花盛期的花序(此时雄蕊已伸出小穗外但未释放花粉)可以提供花粉。从父本植株的花序上收集花粉，然后解开母本花序上的套袋，立即给母本花序的雌蕊柱头进行人工授粉；授粉结束后，仍然用硫酸纸袋套袋并封口，防止其它来源的花粉飘入造成混杂。

[0059] 3、结实率统计：授粉一个月后收集已成熟的自交或杂交套袋花序，每个组合随机选取3个花序(相当于3次重复)进行结实率统计，结实率 = (种子粒数/花序上小穗总数) ×

100%。结果表明,Ms344和Ms420的正反交组合中均收获到种子,表现为杂交亲和,但每个杂交组合中3次重复的结果之间差异显著(表1)。

[0060] 室外开展芒草的人工杂交仅能局限于每年父本与母本开花期相遇重叠的期间内开展,尽管Ms344和Ms420的开花期均在9月中旬至10月中旬,但真正适合授粉杂交的窗口时间只有扬花盛期的5-7天,如果期间遇到阴雨等不利天气则杂交授粉的成功率更低。此外,授粉后田间气候条件(温度、湿度、风力、降雨)等多种因素还会影响最终的结实率。

[0061] 表1 芒基因型Ms344和Ms420正反交组合的结实率

	授粉组合	结实率		
[0062]	Ms344♀×Ms420♂	7.37%	15.5%	23.7%
	Ms420♀×Ms344♂	1%	1%	13.5%

[0063] 本申请人针对方法中的某些步骤进行过深入的探索:

[0064] 例如:植株修剪:芒草植株生长发育成熟进入开花期之后,每天定时检查植株,设置四种处理:(1)单个分蘖枝上的花序开花散粉后不进行修剪,每天定期浇一次水,每周仅补充一次Hoagland植物营养液;(2)单个分蘖枝上的花序开花散粉后不进行修剪,每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液;(3)单个分蘖枝上的花序开花散粉完毕后立即进行修剪,及时用枝剪从分蘖枝基部切断并清理干净,每天定期浇一次水,每周仅补充一次Hoagland植物营养液;(4)单个分蘖枝上的花序开花散粉完毕后立即进行修剪,及时用枝剪从分蘖枝基部切断并清理干净,每天上午和下午分别补充浇一次水以及一次Hoagland植物营养液。

[0065] 结果表明,处理(1)和(2)的植株在所有分蘖枝上的花序开花散粉完毕后,整个植株最后均衰老枯黄,植株基部不会抽生出新的有效分蘖;处理(3)的植株可以从基部抽生出少量新的分蘖枝,来源于根状茎上嫩芽的萌发,但这些新分蘖枝数量较少,生长速度慢,约两个月后才能逐步进入开花期;处理(4)的植株可以不断地从基部抽生出新的分蘖枝,且10~15天内即可发育成熟,然后抽穗开花,如此循环往复,即可实现芒草植株在温室培养条件下周年抽穗开花。由此可见,及时修剪可以阻断衰老信号从衰老枯黄的分蘖枝向根状茎组织的传递,促进根状茎上嫩芽的萌发,而修剪后补充充足的营养液有利于加快新分蘖枝生长发育和抽穗开花。

[0066] 又例如:黑暗诱导处理:从植株上选取进入盛花期的花序,用枝剪清除花序上已经开放的少量小穗,然后将植株转移到暗室中,在22℃~25℃、完全黑暗的条件下分别诱导4、6、8、10和12小时,以光照处理的作为对照,见表2。

[0067] 结果表明,黑暗诱导有利于促进芒草小穗外稃张开,其中诱导处理8-12小时的花序上有超过50%小穗的花药和雌蕊柱头已经露出外稃,有利于提供足量的花粉。

[0068] 表2不同时间的黑暗诱导处理对芒草小穗开放的影响

	黑暗诱导时间	花序上外稃已张开的小穗比例	平均值
	对照	0	0
	4 小时	0~4.7%	2.5%
[0069]	6 小时	6.4%~11.8%	8.3%
	8 小时	54.3%~60.1%	57.0%
	10 小时	52.4%~65.5%	59.2%
	12 小时	57.2%~68.8%	61.7%

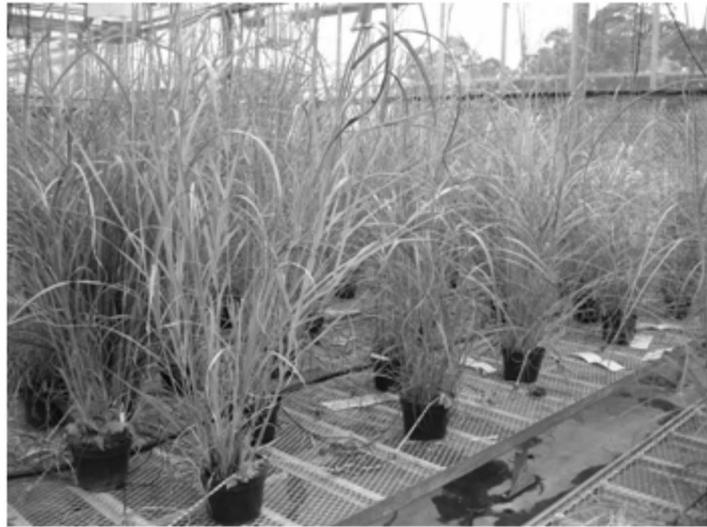


图1



图2

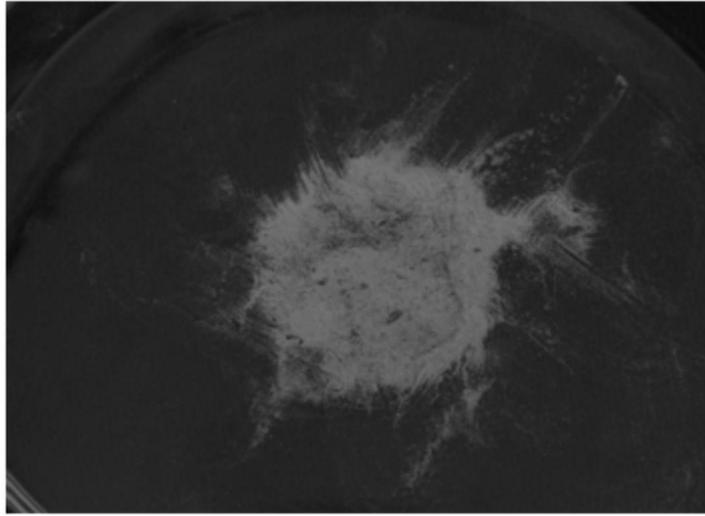


图3