



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362649 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201711362369.7

(22)申请日 2017.12.18

(71)申请人 温州科技职业学院

地址 325000 浙江省温州市瓯海区东方南路38号温州市国家大学科技园孵化器

(72)发明人 朱世杨 张小玲 刘庆 罗天宽  
唐征 徐谦 裘波音

(74)专利代理机构 温州名创知识产权代理有限公司 33258

代理人 陈加利

(51)Int.Cl.

G01N 21/25(2006.01)

A01H 1/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法,其特征在于包括以下步骤:(1)在花椰菜杂交种子生产中,采用下胚轴为绿色或紫色的不育系作为母本,以下胚轴为紫色或绿色的亲本作为父本,杂交获得花椰菜杂交种子,并将种子随机抽取样本数a,培育成杂交种幼苗,作为检测组;(2)根据花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色作为标记性状,判断杂交的花椰菜杂交种子的纯度,其判断方法为:数出花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色为紫色的幼苗数b,则杂交种子的纯度为 $M=b/a$ 。本发明的优点是能够快速计算和判断杂交种的纯度,从而相对于现有技术分子引物检测方法,降低了检测难度和成本。

1. 一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法,其特征包括以下步骤:(1)在花椰菜杂交种子生产中,采用下胚轴为绿色或紫色的不育系作为母本,以下胚轴为紫色或绿色的亲本作为父本,杂交获得花椰菜杂交种子,并将种子随机抽取样本数 $a$ ,培育成花椰菜杂交种幼苗,作为检测组;

(2)根据花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色作为标记性状,判断杂交的花椰菜杂交种子的纯度,其判断方法为:数出花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色为紫色的幼苗数 $b$ ,则杂交种纯度为 $M=b/a$ 。

2. 根据权利要求1所述的基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法,其特征包括:所述的检测组包括有3组,每组检测组的样本数分别为 $a_1$ 、 $a_2$ 和 $a_3$ ,各检测组的下胚轴的颜色为紫色的幼苗数分别为 $b_1$ 、 $b_2$ 和 $b_3$ ,分别计算出各检测组的杂交种纯度 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ ,其中, $M_1=b_1/a_1$ 、 $M_2=b_2/a_2$ 、 $M_3=b_3/a_3$ ,然后将 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ 加权平均获得杂交种纯度为 $M$ 。

## 一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于农业蔬菜育种领域,具体是指一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法。

### 背景技术

[0002] 花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.,  $2n = 18, CC$ )属于十字花科芸薹属甘蓝种。花椰菜以花球为食用器官,营养丰富、味道鲜美,具有防癌之功效,深受广大消费者的喜爱。根据世界粮农组织(FAO)数据(2014),中国花椰菜种植面积约47.8万公顷,总产量约936.6万吨,分别占全球花椰菜种植的34.6%和38.7%,位居世界第一。种子纯度是种子质量分级的主要标准,关系到农业的稳产增产和农民的切身利益。现有技术中,应用SSR、SRAP、EST-SSR等分子标记能够鉴定花椰菜种子纯度。但是花椰菜分子引物开发成本大,特异性分子标记引物需要大量的筛选,加上仪器设备及操作技术要求较高,广泛应用于种子纯度检测有一定的难度。因此有必要开发一种成本更低,直观可靠的种子纯度检测方法。

### 发明内容

[0003] 本发明实施例所要解决的技术问题在于,提供一种基于花椰菜幼苗下胚轴的颜色检测杂交种纯度的方法。该方法通过对花椰菜下胚轴颜色的遗传规律研究,将下胚轴颜色作为标记性状,应用到花椰菜杂交制种中,可以较为直观地进行杂交种子纯度的鉴定。

[0004] 为实现上述目的,本发明的技术方案是包括以下步骤:

(1)在花椰菜杂交制种中,采用下胚轴为绿色或紫色的不育系作为母本,以下胚轴为紫色或绿色的亲本作为父本,杂交获得花椰菜杂交种子,并将种子随机抽取样本数 $a$ ,培育成花椰菜杂交种幼苗,作为检测组;

(2)根据花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色作为标记性状,判断杂交的花椰菜杂交种子的纯度,其判断方法为:数出花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色为紫色的幼苗数 $b$ ,则杂交种纯度为 $M=b/a$ 。

[0005] 进一步设置是所述的检测组包括有3组,每组检测组的样本数分别为 $a_1$ 、 $a_2$ 和 $a_3$ ,各检测组的下胚轴的颜色为紫色的幼苗数分别为 $b_1$ 、 $b_2$ 和 $b_3$ ,分别计算出各检测组的杂交种纯度 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ ,其中, $M_1=b_1/a_1$ 、 $M_2=b_2/a_2$ 、 $M_3=b_3/a_3$ ,然后将 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ 加权平均获得杂交种纯度为 $M$ 。

[0006] 本申请发明人首创发现花椰菜下胚轴颜色为紫色对绿色的显性性状规律,并将其下胚轴颜色作为标记性状,快速计算和判断杂交种的纯度,从而相对于现有技术的分子引物检测方法,降低了检测难度和成本。

[0007] 具体见实施例来例证。

### 具体实施方式

[0008] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合实施例对本发明作进

一步地详细描述。

## [0009] 一、花椰菜幼苗下胚轴紫色性状的遗传分析

### 1 材料与方法

#### 1.1 六个世代群体构建

花椰菜亲本材料为下胚轴为紫色的自交系Y1和下胚轴为绿色的自交系Y24,均由温州市农业科学研究院花椰菜课题组提供。通过杂交、回交、自交构建6个世代群体(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>)。具体方法:在温州市农业科学研究院藤桥基地将下胚轴紫色自交系Y1(P<sub>1</sub>)和下胚轴绿色自交系Y24(P<sub>2</sub>)正反杂交获得F<sub>1</sub>(Y1×Y24、Y24×Y1);2014年春季,将F<sub>1</sub>(Y1×Y24)与亲本P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>分别回交获得B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>群体,自交获得F<sub>2</sub>群体。杂交时,用镊子将母本花朵的花药小心剔除,然后将父本花朵的花粉轻轻涂抹在人工去雄后的母本柱头上。回交时,用相同方法将供体亲本的花粉轻轻涂抹在经过人工去雄的杂种F<sub>1</sub>花朵的柱头上。自交时,选择健壮花枝套袋隔离强迫自交。

#### [0010] 1.2 下胚轴颜色调查

分别将6个世代群体(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>)的种子播于垫有2层滤纸的培养皿(Φ=9cm)中,盖上培养皿盖置于培养室(25℃,光照:黑暗=12:12)中培养。第6d,目测幼苗下胚轴的颜色,分类进行记载。下胚轴颜色调查过程中不考虑紫色颜色的深浅。

#### [0011] 1.3 数据分析

将调查数据输入EXCEL表格,参考盖钧镒书(《试验统计方法》[M].北京:中国农业出版社,2000)中方法对下胚轴紫色、绿色亲本及其后代下胚轴颜色的遗传分离比例进行 $\chi^2$ 的适合性测验。

## [0012] 2 结果与分析

由表1所示:F<sub>1</sub>代花椰菜幼苗的下胚轴颜色均表现为紫色,表明参试花椰菜材料下胚轴颜色遗传紫色对绿色为显性性状。同时正反交F<sub>1</sub>幼苗的下胚轴颜色均为紫色,表明细胞质对花椰菜材料下胚轴颜色遗传没有影响,下胚轴颜色由细胞核基因控制。Y1×Y24杂交F<sub>1</sub>代自交获得的F<sub>2</sub>代群体中幼苗的下胚轴颜色发生了紫色、绿色分离,下胚轴紫色幼苗数与下胚轴绿色幼苗数的比例接近3:1(表1)。经卡平方测验, $\chi^2=1.085$ ,小于 $\chi^2_{0.05}=3.84$ ,说明,花椰菜F<sub>2</sub>代群体幼苗的下胚轴紫色与绿色的分离比例符合3:1。表明,花椰菜材料幼苗的下胚轴颜色受单基因位点控制,紫色对绿色为显性性状。以杂交Y1×Y24组合植株为母本,分别与Y1、Y24进行回交,获得了回交群体B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>。B<sub>1</sub>群体下胚轴颜色均表现为紫色;而B<sub>2</sub>群体下胚轴颜色则发生了紫色、绿色分离,下胚轴紫色幼苗数与下胚轴绿色幼苗数的比例约为1:1。经卡平方测验, $\chi^2=0.351$ ,小于 $\chi^2_{0.05}=3.84$ ,说明回交群体B<sub>2</sub>下胚轴紫色与绿色的分离比例符合1:1。此结果进一步说明,花椰菜材料幼苗的下胚轴颜色受单基因位点控制,紫色对绿色为显性性状。

#### [0013] 表1 花椰菜亲本及后代下胚轴颜色遗传分离比例

世代	幼苗总数/苗	紫色下胚轴/苗	绿色下胚轴/苗	比例	$\chi^2$	$\chi^2_{0.05}$
P <sub>1</sub>	98	98	0	-	-	-
P <sub>2</sub>	95	0	95	-	-	-
F <sub>1</sub> (Y1×Y24)	93	93	0	-	-	-
F <sub>1</sub> (Y24×Y1)	96	96	0	-	-	-
F <sub>2</sub>	398	289	109	3:1	1.085	3.84
B <sub>1</sub>	239	239	0	-	-	-
B <sub>2</sub>	231	129	111	1:1	0.351	3.84

二、利用花椰菜幼苗下胚轴紫色性状检测杂交种纯度的验证

鉴于上述研究结果：花椰菜下胚轴颜色由一对细胞核基因控制，紫色对绿色为显性。花椰菜育种中可以通过杂交、回交等手段将控制下胚轴绿色或紫色的基因转入不育系加以利用。

[0014] 具体以杂交种F<sub>1</sub>为例，在花椰菜杂交制种中，采用下胚轴为绿色的不育系作为母本，以下胚轴为紫色的亲本作为父本，根据下胚轴颜色的紫、绿就很容易鉴别出父母本的纯度。根据孟德尔遗传规律，下胚轴紫色对绿色为显性，则上述父母本配制的真杂交种F<sub>1</sub>幼苗下胚轴应该全部为紫色，播种后出芽时若发现F<sub>1</sub>幼苗下胚轴有绿色的，则多为假杂种，可能是混入了母本种子。反之，采用下胚轴为紫色的不育系作为母本，以下胚轴为绿色的亲本作为父本，获得的杂交种F<sub>1</sub>幼苗下胚轴的颜色也应全部为紫色。杂交制种中可以考虑将花椰菜幼苗下胚轴颜色紫、绿作为父母本防伪及杂交种F<sub>1</sub>纯度鉴定的标记性状。

[0015] 为了验证上述推测：(1)以花椰菜下胚轴紫色自交系(Y1、YP-1)为父本，分别与下胚轴绿色的花椰菜不育系(CMS Y-6、CMS FA-7)为母本，进行杂交获得杂交种F<sub>1</sub>，再将杂交种F<sub>1</sub>种子播于垫有2层滤纸的培养皿(Φ = 9cm)中，盖上培养皿盖置于培养室(25℃，光照：黑暗 = 12:12)中培养。第6d目测幼苗下胚轴的颜色。结果发现(表2)：下胚轴紫色自交系与下胚轴绿色不育系杂交获得的杂交种F<sub>1</sub>幼苗的下胚轴颜色均为紫色。(2)反之，以花椰菜下胚轴绿色自交系(YP-3)为父本，分别与下胚轴紫色的花椰菜不育系(CMS FZ-11、CMS FZ-12、CMS FA-13)为母本，进行杂交获得杂交种F<sub>1</sub>，再将杂交种F<sub>1</sub>种子播于垫有2层滤纸的培养皿(Φ = 9cm)中，盖上培养皿盖置于培养室(25℃，光照：黑暗 = 12:12)中培养。第6d目测幼苗下胚轴的颜色。结果发现(表3)：下胚轴绿色自交系与下胚轴紫色不育系杂交获得的杂交种F<sub>1</sub>幼苗的下胚轴颜色也均为紫色。这些结果验证了上述推测：花椰菜幼苗下胚轴颜色紫色对绿色为显性，利用花椰菜幼苗下胚轴紫色性状可以检测杂交种F<sub>1</sub>纯度。

[0016] 表2下胚轴绿色不育系与下胚轴紫色自交系杂交F<sub>1</sub>下胚轴的颜色

下胚轴绿色不育系	下胚轴紫色自交系	杂交种F <sub>1</sub> 下胚轴颜色
CMS Y-6	Y1	紫色
	YP-1	紫色
CMS FA-7	Y1	紫色
	YP-1	紫色

表3下胚轴紫色不育系与下胚轴绿色自交系杂交F<sub>1</sub>下胚轴的颜色

下胚轴紫色不育系	下胚轴绿色自交系	杂交种 F1 下胚轴颜色
CMS FZ-11		紫色
CMS FZ-12	XP-3	紫色
CMS FA-13		紫色

### 三、下胚轴颜色标记的杂交种纯度检测的应用

上述本发明人的研究结果表明,花椰菜下胚轴颜色由一对细胞核基因控制,紫色对绿色为显性。因此,花椰菜育种中可以通过杂交、回交等手段将控制下胚轴紫色的基因转入不育系加以利用。

[0017] 其应用方法为:

(1)在花椰菜杂交制种中,采用下胚轴为绿色或紫色的不育系作为母本,以下胚轴为紫色或绿色的亲本作为父本,杂交获得花椰菜杂交种子,并将种子随机抽取样本数 $a$ ,培育成花椰菜杂交种幼苗,作为检测组;

(2)根据花椰菜杂交幼苗下胚轴的颜色作为标记性状,判断杂交的花椰菜杂交种子的纯度,其判断方法为:数出花椰菜杂交种幼苗下胚轴的颜色为紫色的幼苗数 $b$ ,则杂交种纯度为 $M=b/a$ 。

[0018] 所述的检测组包括有3组,每组检测组的样本数分别为 $a_1$ 、 $a_2$ 和 $a_3$ ,各检测组的下胚轴的颜色为紫色的幼苗数分别为 $b_1$ 、 $b_2$ 和 $b_3$ ,分别计算出各检测组的杂交种纯度 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ ,其中, $M_1=b_1/a_1$ 、 $M_2=b_2/a_2$ 、 $M_3=b_3/a_3$ ,然后将 $M_1$ 、 $M_2$ 和 $M_3$ 加权平均获得杂交种纯度为 $M$ 。

[0019] 以上所揭露的仅为本发明较佳实施例而已,当然不能以此来限定本发明之权利范围,因此依本发明权利要求所作的等同变化,仍属本发明所涵盖的范围。