



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104351037 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410493914.6

(22)申请日 2014.09.24

(83)生物保藏信息

CGMCC No.8657 2013.12.25

(73)专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72)发明人 赵久然 宋伟 邢锦丰 王元东

段民孝 刘春阁 冯培煜 张如养

王凤格 毛振武 李瑞媛 王乃顺

王文广 张莎莎

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 103430826 A,2013.12.11,全文.

王卫红等.高产 高淀粉玉米品种 NK 718 的选育与栽培技术.《新品种选育与推广》.2012,第31卷(第11期),第1节.

审查员 王岩

权利要求书2页 说明书11页  
序列表19页

(54)发明名称

NK718三系配套杂交种制种方法

(57)摘要

本发明公开了一种NK718三系配套杂交种制种方法,本发明提供了一种杂交制种的方法,包括如下步骤:以玉米不育系S京464为不育系,玉米自交系京464为保持系,玉米自交系京2416为恢复系,进行三系配套制种,得到杂交种NK718。本发明的实验证明,本发明利用育成的不育系S京464、保持系京464和恢复系京2416进行NK718三系配套杂交种制种,配制的不育化杂交种NK718种子在产量、抗性及其他农艺性状上与常规制种方法生产的NK718种子基本相同。

1. 一种杂交制种的方法,包括如下步骤:以玉米不育系S京464为不育系,玉米自交系京464为保持系,玉米自交系京2416为恢复系,进行三系配套制种,得到杂交种NK718;所述不育系S京464按照包括如下步骤的方法转育:

- a) 玉米不育系S京724做母本,京464做父本杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;
- b) 以所述雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京464回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;
- c) 以所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株为母本、与京464继续回交,得到京464的雄性不育系。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

在步骤b)和c)之间,还包括分子鉴定的步骤,所述分子鉴定为用SSR核心引物umc2105k3、bnlg240k1、umc1231k4对所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株进行PCR扩增,选取扩增图谱与用同样引物对所述京464进行PCR扩增得到的图谱相同的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株;

所述核心引物umc2105k3是由序列表中序列9所示的单链DNA分子和序列表中序列10所示的单链DNA分子组成的引物对;

所述核心引物bnlg240k1是由序列表中序列29所示的单链DNA分子和序列表中序列30所示的单链DNA分子组成的引物对;

所述核心引物umc1231k4是由序列表中序列75所示的单链DNA分子和序列表中序列76所示的单链DNA分子组成的引物对。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:

在步骤b)和c)之间的分子鉴定前还包括表型鉴定的步骤,所述表型鉴定为选取所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中表型与京464一致的BC<sub>1</sub>代单株。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于:

所述不育系S京724为按照包括如下步骤的方法选育:以保藏号为CGMCC No.8657的玉米不育系MD32为供体、玉米自交系京724为受体,进行回交转育,得到京724的雄性不育系S京724。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于:所述回交次数为3次;

所述回交转育具体包括如下步骤:

1) 以保藏号为CGMCC No.8657的玉米不育系MD32为供体、玉米自交系京724为受体,杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;

2) 以雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京724回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;

3) 以雄性不育BC<sub>1</sub>代单株为母本、与京724继续回交,得到雄性不育BC<sub>2</sub>代群体;

4) 以雄性不育BC<sub>2</sub>代单株为母本、与京724继续回交,得到京724的雄性不育系S京724。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:在步骤2)和步骤3)之间,还包括如下分子鉴定的步骤:从所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中选取与所述京724遗传相似度在92.5-95%的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:在所述分子鉴定前还包括如下步骤:从所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中选取表型与所述京724一致的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株;

在步骤3)和步骤4)之间,还包括如下分子鉴定的步骤:从所述雄性不育BC<sub>2</sub>代群体中选取与所述京724遗传相似度在98.75%-100%的雄性不育BC<sub>2</sub>代单株;

在所述分子鉴定前还包括如下步骤:从所述雄性不育BC<sub>2</sub>代群体中选取表型与所述京724一致的雄性不育BC<sub>2</sub>代单株。

8. 一种培育不育系S京464的方法,包括如下步骤:

a) 玉米不育系S京724做母本,京464做父本杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;

b) 以所述雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京464回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;

c) 以所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株为母本、与京464继续回交,得到京464的雄性不育系;在步骤b)和c)之间,还具体包括分子鉴定的步骤,所述分子鉴定为用SSR核心引物umc2105k3、bn1g240k1、umc1231k4对所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株进行PCR扩增,选取扩增图谱与用同样引物对所述京464进行PCR扩增得到的图谱相同的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株;

所述核心引物umc2105k3是由序列表中序列9所示的单链DNA分子和序列表中序列10所示的单链DNA分子组成的引物对;

所述核心引物bn1g240k1是由序列表中序列29所示的单链DNA分子和序列表中序列30所示的单链DNA分子组成的引物对;

所述核心引物umc1231k4是由序列表中序列75所示的单链DNA分子和序列表中序列76所示的单链DNA分子组成的引物对;

在步骤b)和c)之间的分子鉴定前还具体包括表型鉴定的步骤,所述表型鉴定为选取所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中表型与京464一致的BC<sub>1</sub>代单株。

9. 权利要求1-8任一所述方法中的所述玉米不育系S京464在杂交制种中的应用。

## NK718三系配套杂交种制种方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种NK718三系配套杂交种制种方法。

### 背景技术

[0002] 强优势杂交种的选育和推广是提高玉米产量的重要途径。利用常规的制种方法配制杂交种需要对母本进行人工去雄,不仅耗费大量的劳动力,增加种子生产成本,且存在由于去雄不及时、不彻底影响种子质量的潜在风险。利用雄性不育系制种是保证种子纯度提高玉米产量的一种有效方法。

[0003] 早在上世纪五六十年代,国内外就开始了对于玉米不育化制种的研究。细胞质雄性不育由于容易实现不育系、保持系和恢复系的配套,是玉米育种中利用的主要类型。细胞质雄性不育系可划分为T、S和C型。60年代初,T型不育系引入我国。由于对玉米小斑病“T小种”专化性侵染,T型不育系的应用受到严重限制。70年代,我国育种工作者从国外引进C型、S型不育系。C型不育系虽然不育性较稳定、彻底,但其恢复系通常需要重新转育,周期长且步骤繁琐,导致该型不育系在实践中难以普及应用。S型不育系是3种类型中最大的一个组,已有研究证明昌7-2等黄改系材料是其天然强恢复系。但S型不育系的育性因基因型背景的不同而有较大差异,在特定的遗传背景下育性高度稳定。国内优良玉米杂交种的父本多属黄改种质,因此充分利用S型不育系可以节省恢复系的转育工作,是实现快速不育化制种研究和应用的有效途径。

[0004] 实现玉米细胞质雄性不育化制种的关键是不育系、保持系和恢复系的选育。选育不育系最常用的方法是回交转育法,即用稳定的不育系作非轮回亲本,选择优良自交系作轮回亲本,进行多代回交,育成不育性稳定的优良不育自交系,而原轮回亲本便是该不育系的保持系。但仅仅利用传统的回交转育方法,一般需回交5-6代,转育周期较长,延缓了不育化制种技术在玉米杂交种上的应用。利用回交转育方法进行恢复系的选育比不育系更为复杂,在回交的同时要进行测交,以测交结果作为恢复系的选择标准;或在回交转育中利用不育细胞质提供育性的指标性状。由于选育过程相对繁琐,在恢复系尚未育成或只有部分恢复性的情况下,须将不育化的杂交种子与正常杂交种种子按适当比例掺合使用,这就给种子生产在技术和管理上提出了更高的要求。因此,如何加快不育系的选育速度、简化恢复系的选育过程,是目前雄性不育化制种技术亟需解决的问题。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种杂交制种的方法。

[0006] 本发明提供的方法,包括如下步骤:以玉米不育系S京464为不育系,玉米自交系京464为保持系,玉米自交系京2416为恢复系,进行三系配套制种,得到杂交种NK718。

[0007] 上述方法中,所述不育系S京464为按照包括如下步骤的方法转育:

[0008] a) 玉米不育系S京724做母本,京464做父本杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;

[0009] b) 以所述雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京464回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;

[0010] c)以所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株为母本、与京464继续回交,得到京464的雄性不育系。

[0011] 上述方法中,在步骤b)和c)之间,还包括分子鉴定的步骤,所述分子鉴定为用SSR核心引物umc2105k3、bnlg240k1、umc1231k4对所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株进行PCR扩增实现分子鉴定,选取扩增图谱与用同样引物对所述京464PCR扩增得到的图谱相同的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株;由于40个SSR核心引物中,S京724和京464只在umc2105k3、bnlg240k1、umc1231k4这三对引物上存在差异,因此只需要检测这三对引物。

[0012] 所述核心引物umc2105k3是由序列表中序列9所示的单链DNA分子和序列表中序列10所示的单链DNA分子组成的引物对;

[0013] 所述核心引物bnlg240k1是由序列表中序列29所示的单链DNA分子和序列表中序列30所示的单链DNA分子组成的引物对;

[0014] 所述核心引物umc1231k4是由序列表中序列75所示的单链DNA分子和序列表中序列76所示的单链DNA分子组成的引物对。

[0015] 上述方法中,为了减少工作量,在步骤b)和c)之间的分子鉴定前还包括表型鉴定的步骤,所述表型鉴定为选取所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中表型与京464一致的BC<sub>1</sub>代单株。

[0016] 上述表型与所述玉米京464一致为表型与玉米京464完全相同或接近;表型具体为株高、穗位高、株型、雄穗分枝数和/或果穗性状等。

[0017] 上述方法中,所述不育系S京724为按照包括如下步骤的方法选育:以玉米S型细胞质雄性不育系MD32CGMCC No.8657为供体、玉米自交系京724为受体,进行回交转育,得到京724的雄性不育系S京724。

[0018] 上述方法中,所述回交次数为3次。

[0019] 上述方法中,所述回交转育包括如下步骤:

[0020] 1)以玉米雄性不育系MD32CGMCC No.8657为供体、玉米自交系京724为受体,杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;

[0021] 2)以雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京724回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;

[0022] 3)以雄性不育BC<sub>1</sub>代单株为母本、与京724继续回交,得到雄性不育BC<sub>2</sub>代群体;

[0023] 4)以雄性不育BC<sub>2</sub>代单株为母本、与京724继续回交,得到京724的雄性不育系S京724。

[0024] 上述方法中,在步骤2)和步骤3)之间,还包括如下分子鉴定的步骤:从所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中选取与所述玉米京724遗传相似度在92.5-95%的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株。

[0025] 上述方法中,所述从所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中选取与所述玉米京724遗传相似度在92.5-95%的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株的方法包括如下步骤:用40对SSR核心引物分别对雄性不育BC<sub>1</sub>代单株和玉米自交系京724进行PCR扩增,得到SSR谱带,通过比较BC<sub>1</sub>代单株和玉米自交系京724的SSR图谱,计算遗传相似度;

[0026] 所述遗传相似度计算公式:[1-(差异等位基因数/(2×比较总位点数))]×100%

[0027] 所述差异等位基因数为用SSR核心引物扩增得到的所述雄性不育BC<sub>1</sub>代单株SSR谱带带型与所述玉米自交系京724的SSR谱带带型不一致的等位基因数目;所述比较总位点数为40。

[0028] 上述40对SSR核心引物中各个引物的序列分别为序列表中序列1-80所示,具体见

实施例的表1。

[0029] 上述方法中,为了减少工作量,在所述分子鉴定前还包括如下步骤:从所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中选取表型与所述玉米京724一致的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株。

[0030] 上述方法中,在步骤3)和步骤4)之间,还具体包括如下分子鉴定的步骤:从所述雄性不育BC<sub>2</sub>代群体中选取与所述玉米京724遗传相似度在98.75%–100%的雄性不育BC<sub>2</sub>代单株。

[0031] 所述从所述雄性不育BC<sub>2</sub>代群体中选取与所述玉米自交系京724遗传相似度在98.75%–100%的雄性不育BC<sub>2</sub>代单株的方法包括如下步骤:用引物A分别对雄性不育BC<sub>2</sub>代单株和玉米自交系京724进行PCR扩增,得到SSR谱带,通过比较BC<sub>2</sub>代单株和玉米自交系京724的SSR图谱,计算遗传相似度;

[0032] 所述引物A为BC<sub>2</sub>代单株对应的母本BC<sub>1</sub>代与京724相比扩增带型不同的SSR引物;

[0033] 所述遗传相似度计算公式:[1-(差异等位基因数/(2×比较总位点数))]×100%

[0034] 所述差异等位基因数为用引物A扩增得到的所述雄性不育BC<sub>2</sub>代单株SSR谱带带型与所述玉米自交系京724的SSR谱带带型不一致的等位基因数目;

[0035] 所述比较总位点数为40。

[0036] 上述方法中,在所述分子鉴定前还具体包括如下步骤:从所述雄性不育BC<sub>2</sub>代群体中选取表型与所述玉米京724一致的雄性不育BC<sub>2</sub>代单株。

[0037] 上述表型与所述玉米京724一致为表型与玉米京724完全相同或接近;表型具体为株高、穗位高、株型、雄穗分枝数和/或果穗性状等。

[0038] 本发明的另一个目的是提供培育不育系S京464的方法。

[0039] 本发明提供的的方法,包括如下步骤:

[0040] a)玉米不育系S京724做母本,京464做父本杂交,得到雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>;

[0041] b)以所述雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>为母本、与京464回交,得到雄性不育BC<sub>1</sub>代群体;

[0042] c)以所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株为母本、与京464继续回交,得到京464的雄性不育系;

[0043] 在步骤b)和c)之间,还具体包括分子鉴定的步骤,所述分子鉴定为用SSR核心引物umc2105k3、bn1g240k1、umc1231k4对所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体单株进行PCR扩增,选取扩增图谱与用同样引物对所述京464进行PCR扩增得到的图谱相同的雄性不育BC<sub>1</sub>代单株;

[0044] 所述核心引物umc2105k3是由序列表中序列9所示的单链DNA分子和序列表中序列10所示的单链DNA分子组成的引物对;

[0045] 所述核心引物bn1g240k1是由序列表中序列29所示的单链DNA分子和序列表中序列30所示的单链DNA分子组成的引物对;

[0046] 所述核心引物umc1231k4是由序列表中序列75所示的单链DNA分子和序列表中序列76所示的单链DNA分子组成的引物对;

[0047] 在步骤b)和c)之间的分子鉴定前还具体包括表型鉴定的步骤,所述表型鉴定为选取所述雄性不育BC<sub>1</sub>代群体中表型与京464一致的BC<sub>1</sub>代单株。

[0048] 上述玉米不育系S京464在杂交制种中的应用也是本发明保护的范畴。

[0049] 本发明的实验证明,本发明具体有如下优势:

[0050] 1、由于昌7-2等黄改材料是S型细胞质雄性不育系的强恢复系,NK718父本京2416

为黄改种质,因此选择京2416具有强恢复性的S型不育系作为母本京464不育系转育的供体,节省了选育父本恢复系的繁琐工作;

[0051] 2、选用已获得的与母本京464亲缘关系较近的不育系S京724为供体,结合分子标记辅助选择技术实现快速转育,仅回交两代即可获得玉米不育系S京464,具有配合力高、抗倒性好、耐密植等优点;

[0052] 3、选用的S型不育系MD32不育性稳定、花粉败育彻底,在已报道的玉米杂交种雄性不育化制种研究中未见使用;

[0053] 总之,本发明利用育成的不育系S京464、保持系京464和恢复系京2416进行NK718三系配套杂交种制种,配制的不育化杂交种NK718种子在产量、抗性及其他农艺性状上与常规制种方法生产的NK718种子基本相同,且节省了常规制种中母本人工去雄的时间和成本,消除了由于去雄不及时、影响种子质量的潜在风险。

### 具体实施方式

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 实施例1、雄性不育系S京724的选育

[0057] 一、不育系供体MD32细胞质雄性不育类型的确定

[0058] 1、玉米不育系MD32

[0059] 玉米不育系MD32选育过程:利用构建的X系群体(以X1132为基础)进行“高大严”选系,从中选择优良S5高代系与外引杂交种构建新的选系基础群体。在自交后代中发现不育株,雄穗花药不外露,选择同穗行表型相近的姊妹株对其进行成对授粉。杂交后代全部表现彻底不育,植株表型也趋向基本一致。遂将该材料命名为玉米雄性不育系MD32。

[0060] 玉米不育系MD32不育性彻底:花药不外露;

[0061] 玉米不育系MD32不育性稳定:在多种遗传背景下,不育性表现彻底;

[0062] 玉米不育系MD32综合性状优良:种子芽势旺盛,出苗力强,幼苗叶鞘色紫色,叶片宽大,叶色浓绿,株型半紧凑,果穗筒型,粒型半硬粒型,综合抗性好。

[0063] 玉米不育系MD32于2013年12月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.8657,该植株分类命名为玉米(*Zea mays*)。

[0064] 2、不育系MD32细胞质雄性不育类型的确定

[0065] 提取玉米不育系MD32幼苗的DNA作为模板,用如下表1的引物进行PCR扩增,得到扩增产物在Agarose凝胶上,90V电泳1小时30分钟。根据扩增片段图谱鉴别玉米MD32胞质不育类型。

[0066] 结果,利用C、T型引物对MD32的DNA进行PCR扩增时,均未检测到扩增产物;利用S型引物对其进行检测时,PCR产物片段大小为885bp。因此确定MD32为S型细胞质雄性不育系。

[0067] 表1 为鉴定胞质类型的引物

[0068]

胞质类型	引物序列
C-1	TGAAAGGGTGGTGAATA

C-2	GAGCCAAAGTAATGAGAAAA
S-1	GATGCTATGCTAAGCGAGAT
S-2	CCGCTAACCCACTCTTCT
T-1	GTCGTGTCCTGGTAGCCT
T-2	CCTCCTTCATTCCGTTGT

[0069] 二、玉米雄性不育系S京724的选育

[0070] 1、雄性不育杂交子代F<sub>1</sub>代的获得

[0071] 第一年夏,以玉米雄性不育系MD32(非轮回亲本)做供体、京724(北京市农林科学院玉米研究中心,品种权申请公告号为CNA007811E)(轮回亲本)做受体杂交组配F<sub>1</sub>代,收获F<sub>1</sub>代的种子。

[0072] 同年冬海南第一代,种植F<sub>1</sub>代的种子,得到127株F<sub>1</sub>代玉米植株。

[0073] 127株F<sub>1</sub>代玉米植株花药均不外露,不育性表现彻底。

[0074] 2、回交一次BC<sub>1</sub>代的获得

[0075] 1)回交

[0076] 以F<sub>1</sub>代植株做母本,继续与轮回亲本京724回交,收获BC<sub>1</sub>代群体的种子。

[0077] 同年冬海南第二代,种植BC<sub>1</sub>代群体的种子,得到BC<sub>1</sub>代群体。

[0078] BC<sub>1</sub>代群体花药均不外露,不育性表现彻底。

[0079] 2)分子鉴定

[0080] 从种植的2000株BC<sub>1</sub>代群体中选择雄花完全不育、植株性状(株高、穗位高、株型、雄穗分枝数和果穗性状等)与京724接近的616个BC<sub>1</sub>代单株挂牌标记;提取616个BC<sub>1</sub>代单株叶片的DNA作为模板,利用40对SSR核心引物(表2)分别对每一株进行PCR扩增;以京724为对照。每对SSR核心引物对应一个位点;每个位点有2个等位基因。

[0081] 表2 为40对SSR核心引物



[0082]

序号	引物名称	上游引物 (5'-3') // 下游引物(5'-3')
1	bnlg439w1	AGTTGACATCGCCATCTTGGTGAC (序列 1) // GAACAAGCCCTTAGCGGGTTGTC (序列 2)
2	umc1335y5	CCTCGTTACGGTTACGCTGCTG (序列 3) // GATGACCCCGCTTACTTCGTTTATG (序列 4)
3	umc2007y4	TTACACAACGCAACACGAGGC (序列 5) // GCTATAGGCCGTAGCTTGGTAGACAC (序列 6)
4	bnlg1940k7	CGTTTAAGAACGGTTGATTGCATTCC (序列 7) // GCCTTATTCTCCCTTGCTTGCC (序列 8)
5	umc2105k3	GAAGGGCAATGAATAGAGCCATGAG (序列 9) // ATGGACTCTGTGCGACTTGTACCG (序列 10)
6	phi053k2	CCCTGCCTCTCAGATTCAGAGATTG (序列 11) // TAGGCTGGCTGGAAGTTTGTGTC (序列 12)
7	phi072k4	GCTCGTCTCCTCCAGGTCAGG (序列 13) // CGTTGCCCATACATCATGCCTC (序列 14)
8	bnlg2291k4	GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG (序列 15) // CATAACCTTGCCCTCCCAAACCC (序列 16)
9	umc1705w1	GGAGGTCGTCAGATGGAGTTCG (序列 17) // CACGTACGGCAATGCAGACAAG (序列 18)
10	bnlg2305k4	CCCCTCTTCCCTCAGCACCTTG (序列 19) // CGTCTTGTCTCCGTCCGTGTG (序列 20)
11	bnlg161k8	TCTCAGCTCCTGCTTATTGCTTTCG (序列 21) //

[0083]

序号	引物名称	上游引物 (5'-3') // 下游引物(5'-3')
		GATGGATGGAGCATGAGCTTGC (序列 22)
12	bnlg1702k1	GATCCGCATTGTCAAATGACCAC (序列 23) // AGGACACGCCATCGTCATCA (序列 24)
13	umc1545y2	AATGCCGTTATCATGCGATGC (序列 25) // GCTTGCTGCTTCTTGAATTGCGT (序列 26)
14	umc1125y3	GGATGATGGCGAGGATGATGTC (序列 27) // CCACCAACCCATACCCATACCAG (序列 28)
15	bnlg240k1	GCAGGTGTCGGGGATTTTCTC (序列 29) // //GGAAGTGAAGAACAGAAGGCATTGATAC (序列 30)
16	phi080k15	TGAACCACCCGATGCAACTTG (序列 31) // TTGATGGGCACGATCTCGTAGTC (序列 32)
17	phi065k9	CGCCTTCAAGAATATCCTTGTGCC (序列 33) // GGACCCAGACCAGGTTCCACC (序列 34)
18	umc1492y1 3	GCGGAAGAGTAGTCGTAGGGCTAGTGTAG (序列 35) // //AACCAAGTTCTTCAGACGCTTCAGG (序列 36)
19	umc1432y6	GAGAAATCAAGAGGTGCGAGCATC (序列 37) // GGCCATGATACAGCAAGAAATGATAAGC (序列 38)
20	umc1506k1 2	GAGGAATGATGTCCGCGAAGAAG (序列 39) // TTCAGTCGAGCGCCCAACAC (序列 40)
21	umc1147y4	AAGAACAGGACTACATGAGGTGCGATAC (序列 41) // GTTTCTTATGGTACAGTTCTCCCTCGC (序列 42)
22	bnlg1671y1 7	CCCGACACCTGAGTTGACCTG (序列 43) // CTGGAGGGTGAAACAAGAGCAATG (序列 44)
23	phi96100y1	TTTTGCACGAGCCATCGTATAACG (序列 45) // CCATCTGCTGATCCGAATACCC (序列 46)
24	umc1536k9	TGATAGGTAGTTAGCATATCCCTGGTATCG (序列 47) // AGCATAGAAAAAGTTGAGGTTAATATGGAGC (序列 48)
25	bnlg1520K1	CACTCTCCCTCTAAAATATCAGACAACACC (序列 49) // GCTTCTGCTGCTGTTTTGTCTTGTG (序列 50)
26	umc1489y3	GCTACCCGCAACCAAGAACTCTTC (序列 51) // GCCTACTCTTGCCGTTTTACTCCTGT (序列 52)
27	bnlg490y4	GGTGTGGAGTCGCTGGGAAAG (序列 53) // TTCTCAGCCAGTGCCAGCTCTTATTA (序列 54)
28	umc1999y3	GGCCACGTTATTGCTCATTTC (序列 55) // GCAACAACAAATGGGATCTCCG (序列 56)
29	umc2115k3	GCACTGGCAACTGTACCCATCG (序列 57) // GGGTTTCACCAACGGGGATAGG (序列 58)

[0084]

序号	引物名称	上游引物 (5'-3') // 下游引物(5'-3')
30	umc1429y7	CTTCTCCTCGGCATCATCCAAAC (序列 59) // GGTGGCCCTGTTAATCCTCATCTG (序列 60)
31	bnlg249k2	GGCAACGGCAATAATCCACAAG (序列 61) // CATCGGCGTTGATTTCGTCAG (序列 62)
32	phi299852y2	AGCAAGCAGTAGGTGGAGGAAGG (序列 63) // AGCTGTTGTGGCTCTTTGCCTGT (序列 64)
33	umc2160k3	TCATTCCCAGAGTGCCTTAACACTG (序列 65) // CTGTGCTCGTGCTTCTCTCTGAGTATT (序列 66)
34	umc1936k4	GCTTGAGGCGGTTGAGGTATGAG (序列 67) // TGCACAGAATAAACATAGGTAGGTCAGGTC (序列 68)
35	bnlg2235y5	CGCACGGCAGATAGAGGTG (序列 69) // AACTGCTTGCCACTGGTACGGTCT (序列 70)
36	phi233376y1	CCGGCAGTCGATTACTCCACG (序列 71) // CAGTAGCCCCTCAAGCAAAACATTC (序列 72)
37	umc2084w2	ACTGATCGCGACGAGTTAATTCAAAC (序列 73) // TACCGAAGAACAACGTCATTTCAGC (序列 74)
38	umc1231k4	ACAGAGGAACGACGGGACCAAT (序列 75) // GGCCTCAGCAAAGAGCCAAATTC (序列 76)
39	phi041y6	CAGCGCCGCAAACCTTGTT (序列 77) // TGGACGCGAACCAGAAACAGAC (序列 78)
40	umc2163w3	CAAGCGGGAATCTGAATCTTTGTT (序列 79) // CTTCGTACCATCTTCCCTACTTCATTGC (序列 80)

[0085] 每个BC<sub>1</sub>代单株得到40个位点对应的PCR扩增图谱,与京724得到的40个位点对应的PCR扩增图谱进行比较,PCR扩增图谱谱带不一致的等位基因数目为差异等位基因数;比较总位点数为40。

[0086] 遗传相似度计算公式:[1-(差异等位基因数/(2×比较总位点数))] $\times$ 100%

[0087] 根据扩增结果,选取与京724差异等位基因数最少的前30个单株作为下一轮回交的母本,且经过遗传相似度计算,前30个单株与京724间的遗传相似度均在92.5-95%之间。

[0088] 3、回交二次BC<sub>2</sub>代的获得

[0089] 1)回交

[0090] 以上述2选取的与京724遗传相似度在92.5-95%之间的BC<sub>1</sub>代单株做母本,继续与轮回亲本京724回交,收获BC<sub>2</sub>代群体的种子。

[0091] 次年夏,种植BC<sub>2</sub>代群体的种子,按穗行田间种植,每个穗行种植50株,共计1500株。

[0092] 2)分子鉴定

[0093] 选择雄花完全不育、植株性状与京724接近的300个BC<sub>2</sub>代单株挂牌标记,分别提取300个BC<sub>2</sub>代单株叶片的DNA作为模板,利用BC<sub>2</sub>代单株对应的母本BC<sub>1</sub>代与京724扩增带型不

同的SSR引物对其进行PCR扩增;以京724为对照。

[0094] 按照上述方法,计算遗传相似度,其中,差异等位基因数为雄性不育BC<sub>2</sub>代单株SSR谱带带型与所述玉米自交系京724的SSR谱带带型不一致的等位基因数目,BC<sub>2</sub>代群体的单株SSR谱带为用BC<sub>2</sub>代单株对应的母本BC<sub>1</sub>代与京724相比扩增带型不一致的SSR引物进行扩增得到的谱带;比较总位点数为40。

[0095] 选取遗传相似度为98.75%-100%(与京724差异等位基因数最少的前30个单株)作为下一轮回交的母本。

[0096] 4、回交3次不育系S京724的获得

[0097] 以上述3选取的与京724遗传相似度在98.75%-100%之间的BC<sub>2</sub>代单株做母本,继续与轮回亲本京724回交,收获BC<sub>3</sub>代群体,即为不育系S京724。

[0098] 不育系S京724花药不外露,不育性表现彻底。

[0099] 三、常规转育与本发明方法的比较

[0100] 常规转育与上述二的方法基本相同,不同的是不进行分子鉴定,结果回交6代,才能获得遗传背景回复到轮回亲本的不育系(遗传背景回复率见表3所示)。

[0101] 计算遗传背景回复率 $G(g)=[L+X(g)]/2L$ ;其中,g指回交世代数,G(g)指在g代的遗传背景回复率;X(g)指在回交g代表现为受体亲本带型的分子标记数量;L指所参与分析的分子标记数量。

[0102] 表3 为本发明方法与常规育种的背景回复率

回交世代	背景回复率	
	常规育种	本发明方法
BC <sub>1</sub>	75%	92.50%
BC <sub>2</sub>	87.50%	98.75%
BC <sub>3</sub>	93.75%	100.00%
BC <sub>4</sub>	96.88%	
BC <sub>5</sub>	98.44%	
BC <sub>6</sub>	99.22%	

[0104] 从上述看出,本发明的方法利用分子标记辅助背景选择与回交转育相结合,只需要回交3代即获得了遗传背景回复到轮回亲本的不育系。

[0105] 实施例2、母本京464不育系S京464的转育

[0106] 由于京464和京724亲缘关系较近,因此选用不育系S京724作为京464不育系转育的供体材料。

[0107] 以不育系S京724做母本,京464(北京市农林科学院玉米研究中心,品种权申请公告号为CNA007810E)做父本杂交组配F<sub>1</sub>代,F<sub>1</sub>代田间表现完全不育;

[0108] 再以F<sub>1</sub>代做母本,继续与京464回交得到BC<sub>1</sub>代群体。

[0109] 从种植的200株BC<sub>1</sub>代群体中选择雄花完全不育、植株性状(株高、穗位高、轴色、雄穗分枝数、果穗性状和生育期等)与京464接近的60个单株挂牌标记;提取BC<sub>1</sub>代单株叶片的DNA作为模板,利用40对SSR核心引物中在S京724和京464间存在差异的三对引物(表2中的

umc2105k3、bnlg240k1、umc1231k4)分别对每一株进行PCR扩增;以京464为对照。选择与京464扩增图谱相同的单株,记作BC<sub>1</sub>-A;

[0110] 将BC<sub>1</sub>-A与京464继续回交得到BC<sub>2</sub>代群体,即母本京464的不育系S京464。

[0111] 观察育性,不育系S京464花药不外露,不育性表现彻底。

[0112] 实施例3、京2416对不育系S京464的恢复性鉴定

[0113] 以由实施例2创制的不育系S京464做母本,京2416(北京市农林科学院玉米研究中心,品种权授权公告号为CNA004319G)做父本,杂交组配F<sub>1</sub>代,收获F<sub>1</sub>代的种子。次年,分别在北京、海南、吉林等多点田间种植F<sub>1</sub>代,得到F<sub>1</sub>代植株。观察鉴定F<sub>1</sub>代植株雄穗的育性恢复情况,均表现为育性恢复正常。

[0114] 说明京2416是不育系S京464的强恢复系,具有完全恢复能力。

[0115] 实施例4、NK718三系配套制种

[0116] 一、三系的繁殖

[0117] 1、不育系繁殖

[0118] 用由实施例2制备的不育系S京464进行不育系繁殖:

[0119] 母本雄性不育系S京464在甘肃扩繁时,与其它玉米花粉来源地空间隔离距离不少于500米。不育系S京464与保持系京464按照8:2行比种植,种植密度为5500株/亩,授粉结束后砍除母本保持系,避免不育系中混入保持系种子。不育系繁殖产量一般在每亩400千克以上。

[0120] 2、保持系繁殖

[0121] 母本保持系京464的繁殖与常规亲本繁殖方法相同。在甘肃扩繁时,与其它玉米花粉来源地空间隔离距离不少于500米。保持系京464种植密度为5500株/亩,繁殖产量一般在每亩400千克以上。

[0122] 3、恢复系繁殖

[0123] 恢复系京2416的繁殖与常规亲本繁殖方法相同。在甘肃扩繁时,与其它玉米花粉来源地空间隔离距离不少于500米。恢复系京2416种植密度为6000株/亩,繁殖产量一般在每亩500千克以上。

[0124] 二、不育化杂交种制种:

[0125] 以不育系S京464为母本,京2416为父本,进行NK718杂交种不育化制种,具体如下:

[0126] 在甘肃制种时,与其它玉米花粉来源地空间隔离距离不少于300米。将母本不育系S京464与父本京2416按照5:1行比种植,种植密度为5500株/亩,母本不育系与父本同期播种,授粉结束后砍除父本行,避免杂交种中混入父本种子。其中行比及父母本播种时间可根据制种实际情况做适当调整。

[0127] 得到不育化杂交种NK718种子。

[0128] 按照国家普通玉米品种区试项目的调查标准,检测不育化杂交种NK718产量、抗性及株型、株高、穗位高、穗型、穗长、穗行数、轴色、千粒重等农艺性状,具体测量方法如下:

[0129] 1、产量:小区果穗风干后脱粒,称量籽粒干重,按标准水份(14%)折算,即为小区产量,再由小区产量折成亩产。

[0130] 2、抗性:按照中华人民共和国农业行业标准《玉米抗病虫性鉴定技术规范》进行玉米螟、大斑病和丝黑穗病等玉米主要病虫害田间接种抗性鉴定,调查记录抗感情况。

[0131] 3、农艺性状

[0132] 1)株型:根据植株叶片的夹角大小,分紧凑、半紧凑、平展三种。

[0133] 2)株高:在乳熟期连续取生育正常的植株10株(定义为取样株),测量地面至雄穗顶端的高度,求其平均数。

[0134] 3)穗位高:测量取样株由地面至第一果穗着生节位的高度,求其平均数。

[0135] 4)穗型:根据果穗形状,分筒型、锥型两种。

[0136] 5)穗长:测量取样株果穗从穗基部到顶端的长度,求其平均数。

[0137] 6)穗行数:计数取样株果穗中部的籽粒行数。

[0138] 7)轴色:分红、白两种。

[0139] 8)千粒重:将取样株果穗脱粒后,籽粒充分混合,从中随机取500粒称重、重复取样3次,将两个相近数相加,即为千粒重。

[0140] 结果不育化杂交种NK718的产量(籽粒重)为每亩867.3千克;

[0141] 经田间抗性接种鉴定,抗玉米螟、中抗大斑病和丝黑穗病等;

[0142] 株高294厘米,穗位高123厘米,筒型穗,穗长17.5厘米,穗行数16行,穗轴白色,千粒重333克。

[0143] 采用常规制种(以京464为母本,以京2416为父本杂交得到NK718)的方法生产的NK718种子在产量、抗性及其他农艺性状上,与上述三系配套产生的NK718无显著差异,但是需要母本人工去雄的步骤,增加了制种成本。

[0144] 因此说明制种成功。

## 序列表

	<110>北京市农林科学院	
	<120>NK718 三系配套杂交种制种方法	
	<160> 80	
	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 1	
	agltgacatc gccatcttgg tgac	24
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
[0001]	<400> 2	
	gaacaagccc ttagegggtt gtc	23
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 3	
	cctegttagc gttagctgc tg	22
	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 4	
	gatgaccecg cttagctgt ttatg	25

	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 5	
	ttacacaacg caacacgagg c	21
	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 6	
	gctataggcc gtagcttggg agacac	26
[0002]	<210> 7	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 7	
	cgtttaagaa cgggtgattg catfcc	26
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 8	
	gccittattt etcccttget tgcc	24
	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> DNA	



	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 9	
	gaagggcaat gaatagagcc atgag	25
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 10	
	atggactctg tgcgacttgt accg	24
	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0003]	<220>	
	<223>	
	<400> 11	
	ccctgcctct cagattcaga gattg	25
	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 12	
	taggctggct ggaagtttgt tgc	23
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 13	

	gctcgtctcc tccaggtcag g	21
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 14	
	cgttgcccat acatcatgcc tc	22
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 15	
	gcacaccctg agtagctgag acttg	25
[0004]	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 16	
	calaacctg cctcccaaac cc	22
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 17	
	ggaggctgctc agatggagtt cg	22
	<210> 18	
	<211> 22	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 18	
	cacglacggc aatgcagaca ag	22
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 19	
	cccctcttcc tcagcacctt g	21
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0005]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 20	
	egtcctgtct cegtcctgt g	21
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 21	
	tctcagetcc tgettaifgc ttteg	25
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	

	<400> 22	
	gatggatgga gcatgagctt gc	22
	<210> 23	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 23	
	gatccgcatt gtcaaatgac cac	23
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 24	
[0006]	aggacacgccc atcgtcatca	20
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 25	
	aatgccgltta tcatgcatg c	21
	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 26	
	gcttgctgct tcttgaattg cgt	23
	<210> 27	

	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 27	
	ggatgatggc gaggatgatg tc	22
	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 28	
	ccaccaacc ataccatac cag	23
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0007]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 29	
	gcaggtgtcg gggatttct c	21
	<210> 30	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 30	
	ggaactgaag aacagaagc attgatac	28
	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223>		
	<400> 31		
	lgaaccaccc gatgcaactt g		21
	<210> 32		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 32		
	ttgatgggca cgatctcgta gtc		23
	<210> 33		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
[0008]	<400> 33		
	cgccttcaag aatatecttg tgcc		24
	<210> 34		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 34		
	ggaccagac caggttccac c		21
	<210> 35		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 35		
	gcggaagagt agtcgtaggg ctagtgtag		29

	<210> 36	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 36	
	aaccaagttc tcagacgct tcagg	25
	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 37	
	gagaaatcaa gaggtgcgag catc	24
[0009]	<210> 38	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 38	
	ggccatgata cagcaagaaa tgataagc	28
	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 39	
	gaggaatgat gtccgcgaag aag	23
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>		
	<400> 40		
	ttcagtcgag cgcccaacac		20
	<210> 41		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 41		
	aagaacagga ctacatgagg tgcgatac		28
	<210> 42		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
[0010]	<400> 42		
	gtttcctatg gtacagttct cccfcgc		27
	<210> 43		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 43		
	cccgacacct gagttgacct g		21
	<210> 44		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 44		
	ctggagggtg aaacaagagc aatg		24



	<210> 45	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 45	
	ttttgcacga gccatcgtat aacg	24
	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 46	
	ccatctgctg atccgaatac cc	22
[0011]	<210> 47	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 47	
	tgataggtag ttagcatatc cctggtatcg	30
	<210> 48	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 48	
	agcatagaaa aagftgaggt taatatggag c	31
	<210> 49	
	<211> 30	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 49	
	cactctccct ctaaaatata agacaacacc	30
	<210> 50	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 50	
	gcctctgctg ctgttttgtt ctg	24
	<210> 51	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0012]	<220>	
	<223>	
	<400> 51	
	gctaccgcea accaagaact cttc	24
	<210> 52	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 52	
	gcctactctt gcgftttac tctgt	26
	<210> 53	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 53	

	ggtgttgag tcgtggaa ag	22
	<210> 54	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 54	
	ttctcagcca gtgccagctc ttatta	26
	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 55	
	ggccaagtta ttgctcattt gc	22
[0013]	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 56	
	gcaacaacaa atgggatctc cg	22
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 57	
	gcactggcaa ctgtacccat cg	22
	<210> 58	
	<211> 22	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 58	
	gggttcacc aacggggata gg	22
	<210> 59	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 59	
	ctctecteg gcatcateca aac	23
	<210> 60	
	<211> 24	
	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 60	
	ggtggccctg ttaatectca tctg	24
	<210> 61	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 61	
	ggcaacggca ataatccaca ag	22
	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	

	<400> 62	
	catcgcggtt gatttcgta g	21
	<210> 63	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 63	
	agcaagcagt aggtggagga agg	23
	<210> 64	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 64	
[0015]	agctgtgtg gcctttgcc tgt	23
	<210> 65	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 65	
	tcattcccag agtgccttaa cactg	25
	<210> 66	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 66	
	ctgtgctcgt gcttctctct gactatt	27
	<210> 67	

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 67	
	gcttgaggcg gitgaggtat gag	23
	<210> 68	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 68	
	tgacagaaat aaacataggl aggtcaggtc	30
	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0016]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 69	
	cgcacggcac gatagaggtg	20
	<210> 70	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 70	
	aactgcttgc cactggtacg gtct	24
	<210> 71	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223>		
	<400> 71		
	ccggcagtcg attactccac g		21
	<210> 72		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 72		
	cagtagcccc tcaagcaaaa catic		25
	<210> 73		
	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
[0017]	<400> 73		
	actgatcgcg acgagttaat tcaaac		26
	<210> 74		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 74		
	taccgaagaa caacgtcatt tcagc		25
	<210> 75		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>		
	<400> 75		
	acagaggaac gacgggacca at		22

	<210> 76	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 76	
	ggcactcagc aaagagccaa attc	24
	<210> 77	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 77	
	cagcgccgca aacttggt	19
[0018]	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 78	
	tggacgcgaa ccagaaacag ac	22
	<210> 79	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>	
	<400> 79	
	caagcgggaa tetgaatctt tgttc	25
	<210> 80	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	



	<220>	
	<223>	
[0019]	<400> 80	
	cttegtacca tettecctac tteattgc	28