



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104981148 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

---

(21) 申请号 201380057584. X (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2013. 11. 04 A01H 1/04(2006. 01)  
(30) 优先权数据 A01H 4/00(2006. 01)  
61/722399 2012. 11. 05 US C12Q 1/68(2006. 01)  
61/786968 2013. 03. 15 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2015. 05. 04  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/068191 2013. 11. 04  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02014/071271 EN 2014. 05. 08  
(71) 申请人 先锋国际良种公司  
地址 美国依阿华州  
(72) 发明人 C. 亨特  
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001  
代理人 邹雪梅 杨思捷

权利要求书2页 说明书9页

---

(54) 发明名称

用于分子分析的胚取样

(57) 摘要

本公开提供了通过使用胚取样促进种质改善活动的新型方法。本发明提供一种方法,所述方法包括获取至少一个分离的胚,从所述至少一个分离的胚切除一片盾片或子叶组织使得胚的发芽可能性不被显著降低,以及分析所述盾片或子叶组织样品是否存在指示至少一个遗传性状的一个或多个特性。

1. 用于分析单子叶植物的分离的胚的方法,所述方法包括:
  - a. 从所述分离的胚切除一片盾片组织,其中所述切除不引起所述分离的胚发芽可能性的显著降低;以及
  - b. 分析所述盾片组织片是否存在指示至少一个遗传性状的一个或多个特性。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述单子叶植物是玉米、高粱、小麦、稻、大麦、燕麦、裸麦、粟、甘蔗、黑小麦、或柳枝稷。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分离的胚获取自种子,或者来源于其它组织。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分离的胚是未成熟的。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分离的胚能够在切除所述盾片组织片后发芽长成植株。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分离的胚是新鲜的或冷却的。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述盾片组织片在取样后是冻干的、新鲜的、冷冻的、或冷却的。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述盾片组织片的尺寸等于或大于单个细胞核。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述切除使用选自下列的工具进行:钻头、喷水器、激光、单刀片、一组相对刀片、注射器、芯取样器(取芯工具)、外科手术刀、小直径的线、小直径的变形钢丝绳、刮刀、和拭子。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述切除通过自动化方法进行。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中分析所述盾片组织片的一个或多个特性,所述特性选自:遗传标记、单核苷酸多态性、简单重复序列、限制性片段长度多态性、单倍型、标签 SNP、遗传标记的等位基因、基因、DNA 来源的序列、RNA 来源的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、微 RNA、siRNA、QTL、卫星标记、转基因、mRNA、ds mRNA、转录模式、甲基化模式、和倍数性水平。
12. 用于分析双子叶植物的分离的胚的方法,所述方法包括:
  - a. 从所述分离的胚切除一片子叶组织,其中所述切除不引起所述分离的胚发芽可能性的显著降低;以及
  - b. 分析所述子叶组织片是否存在指示至少一个遗传性状的一个或多个特性。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述双子叶植物是卡诺拉、大豆、向日葵、苜蓿、或棉花。
14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述分离的胚获取自种子,或者来源于其它组织。
15. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述分离的胚是未成熟的。
16. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述分离的胚能够在切除所述子叶组织片后发芽长成植株。
17. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述分离的胚是新鲜的或冷却的。
18. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述子叶组织片在取样后是冻干的、新鲜的、冷冻的、或冷却的。
19. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述子叶组织片的尺寸等于或大于单个细胞核。

20. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述切除使用选自下列的工具进行:钻头、喷水器、激光、单刀片、一组相对刀片、注射器、芯取样器(取芯工具)、外科手术刀、小直径的线、小直径的变形钢丝绳、刮刀、和拭子。

21. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述切除通过自动化方法进行。

22. 根据权利要求 12 所述的方法,其中分析所述子叶组织片的一个或多个特性,所述特性选自:遗传标记、单核苷酸多态性、简单重复序列、限制性片段长度多态性、单倍型、标签 SNP、遗传标记的等位基因、基因、DNA 来源的序列、RNA 来源的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、微 RNA、siRNA、QTL、卫星标记、转基因、mRNA、ds mRNA、转录模式、甲基化模式、和倍数性水平。

## 用于分子分析的胚取样

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于 2013 年 3 月 15 日的美国临时申请 61/786968 和提交于 2012 年 11 月 5 日的美国临时申请 61/722399 的权益,它们全部内容以引用方式并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于取样分离的胚以鉴定能够发育成具有所需特性的植株的胚的方法。

### 背景技术

[0004] 在传统的植物育种中,种植基于已知的杂交或自花授粉的植物世代并且随后进行测试,从而得知品系或品种是否趋于具有市场上期望的特性。这是本领域可认识到并且熟知的,这些实验可为大规模的。它们涉及从科学家到现场工作人员范围内的大量劳动力以设计、种植、维护、以及进行实验,可能涉及几千或几万株单个植株。它们也需要可观的土地资源。实验田或温室可能占据几千英亩土地。当植株萌发、生长、以及产生种子期间(在此期间可对它们采样用于实验室或田间测试),这不但占据大量土地数月之久,而且之后的大量种子必须进行单独标记、收获和处理。

[0005] 一个另外的问题是很多实验是无效结果。文献已经报道一些种子公司在实验中弃去早期任何世代的 80-90% 的植株。因此,对于大部分种子,供其生长、收获、及收获后处理所消耗的大量土地、劳动力和材料资源最终被浪费了。

[0006] 时间压力也是一个因素。植物育种方面的显著进步已经施加更多的压力于育种程序,以较快速地推进植物品系或品种获得更多更好的性状和特性。植物育种者和相关联的工人因此受到增大的压力以更高效地和更有效地处理这些世代,以及更多更早地选择应继续进行下一代育种的植株。

[0007] 多个当前使用的方案已经加速了植物育种产生的收获,并且具有相当大的成本节约。例如,用于产生加倍单倍体的方案已经不需要多年的自交以及后续的评估来获得纯合植株。此外,遗传标记数据的应用以及获取它们的便利性已经允许在消耗大量资源之前从种群中去除不包含期望特性的植株。此外,近来的案例已经利用在种子阶段基于实验室的测试,通常称为“籽粒切片”或“种子切片”,其中种子进行非破坏性测试以获取遗传、生物化学或表型信息(Sangtong, V. 等人(2001)Plant Molecular Biology Reporter 19: 151-158)。测试种子不需要使种子生长成幼苗,从而节省了时间、空间、和工作量。

[0008] 然而,仍可进行进一步改善。具体地,需要甚至在发育更早期分子表征胚的方法,尤其是作为加倍单倍体方法或利用胚挽救技术的其它方法的一部分。

### 发明内容

[0009] 本公开涉及通过使用胚取样促进植物改善活动的方法。通过本文所述方法,测试各个分离的胚并仅选择能够发育成具有一个或多个期望特性的植株的那些胚是可能的。这

允许用于植物改善和管理的新的和更有效的方法,产生改善的育种群体。

[0010] 本文提供了分析单子叶植物的分离的胚的方法。在此类方法中,从分离的胚切除一片盾片组织,其中所述切除不引起胚发芽可能性的显著降低。随后分析该片盾片组织是否存在指示至少一个遗传性状的一个或多个特性。

[0011] 分离的胚可为未成熟的,并且它可来自玉米、高粱、小麦、稻、大麦、燕麦、裸麦、粟、甘蔗、黑小麦、或柳枝稷。分离的胚可直接获取自种子,或者它可来源于其它组织。分离的胚可为新鲜的或冷却的。分离的胚是活的并且能够在切除所述盾片组织片后发芽长成植株。分离的胚可为任意倍数性的,诸如但不限于单倍体、二倍体、加倍单倍体、非整倍体、四倍体、六倍体、或八倍体。

[0012] 从分离的胚切除的该片盾片组织在取样后可为冻干的、新鲜的、冷冻的、或冷却的。

[0013] 该片盾片组织的尺寸可等于或大于单个细胞核。

[0014] 盾片组织的切除可通过本领域已知的任何装置进行,诸如但不限于:钻头、喷水器、激光、单刀片、一组相对刀片、注射器、芯取样器(取芯工具)、外科手术刀、小直径的线、小直径的变形钢丝绳、刮刀、和拭子。切除可手动进行或通过自动化方法进行。

[0015] 分离的胚可定位为分生组织向下,其中从分生组织的相对端切片。定位可手动进行或利用机械运动、致动等以自动化方式进行。自动化可包括使用机器人、视觉系统、或二者的组合。

[0016] 可分析盾片组织的片的一个或多个特性,所述特性选自:遗传标记、单核苷酸多态性、简单重复序列、限制性片段长度多态性、单倍型、标签 SNP、遗传标记的等位基因、基因、DNA 来源的序列、RNA 来源的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、微 RNA、siRNA、QTL、卫星标记、转基因、mRNA、ds mRNA、转录模式、甲基化模式、和倍数性水平。

[0017] 本文提供了分析双子叶植物的分离的胚的方法。在此类方法中,从分离的胚切除一片子叶组织,其中所述切除不引起胚发芽可能性的显著降低。随后分析该片子叶组织是否存在指示至少一个遗传性状的一个或多个特性。

[0018] 分离的胚可为未成熟的,并且其可为卡诺拉、大豆、向日葵、苜蓿、或棉花。分离的胚可直接获取自种子,或者它可来源于其它组织。分离的胚可为新鲜的或冷却的。分离的胚是活的并且能够在切除所述子叶组织片后发芽长成植株。分离的胚可为任意倍数性的,诸如但不限于单倍体、二倍体、加倍单倍体、非整倍体、四倍体、六倍体、或八倍体。

[0019] 从分离的胚中切除的该片子叶组织在取样后可为冻干的、新鲜的、冷冻的、或冷却的。

[0020] 该片子叶组织的尺寸可等于或大于单个细胞核。

[0021] 子叶组织的切除可通过本领域已知的任何装置进行,诸如但不限于:钻头、喷水器、激光、单刀片、一组相对刀片、注射器、芯取样器(取芯工具)、外科手术刀、小直径的线、小直径的变形钢丝绳、刮刀、和拭子。切除可手动进行或通过自动化方法进行。

[0022] 可分析子叶组织的片的一个或多个特性,所述特性选自:遗传标记、单核苷酸多态性、简单重复序列、限制性片段长度多态性、单倍型、标签 SNP、遗传标记的等位基因、基因、DNA 来源的序列、RNA 来源的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、微 RNA、siRNA、QTL、卫星标记、转基因、mRNA、ds mRNA、转录模式、甲基化模式、和倍数性水平。

## 具体实施方式

[0023] 本文中所列出的每个参考集的公开内容均据此全文以引用方式并入本文。

[0024] 除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”以及“所述”包括复数涵义。因此,例如,“一株植物(a plant)”的涵义包括多株此类植物,“一个细胞(a cell)”的涵义包括一个或多个细胞以及它们为本领域技术人员所知的等同物,诸如此类。

[0025] 如本文所用:

[0026] “愈伤组织”是指去分化的增殖细胞块或组织块。

[0027] 短语“接触”、“与...接触”或“与...接触放置”可用于指代“直接接触”或“间接接触”。例如,包含加倍剂的培养基可直接接触单倍体细胞或者包含加倍剂的培养基可通过滤纸、植物组织、或其它细胞与单倍体细胞分开,从而加倍剂通过滤纸或细胞转移到单倍体细胞中。

[0028] “二倍体”植物具有两组(基因组)染色体并且染色体数(2n)等于合子的染色体数。

[0029] “加倍单倍体”或加倍单倍体植物或细胞通过加倍染色体单倍体组发育。获取自自交任意数目世代的加倍单倍体植物的植物或种子仍可认为是加倍单倍体植物。认为加倍单倍体植物是纯合植物。如果一株植物是能繁殖的,将认为它是加倍单倍体,即使植物的整个营养部分不包括具有加倍染色体组的细胞。例如,如果一株植物包含活的配子,将认为它是加倍单倍体植物,即使它是嵌合的。

[0030] “加倍单倍体胚”是具有一个或多个含有2组纯合染色体的细胞的胚。

[0031] “胚形成”可定义为胚形成、增殖和/或发育的过程。

[0032] 在细胞或组织的语境中,“胚形成的”是指细胞或组织可在适当的培养条件下被诱导形成活的植物胚。

[0033] “发芽”是指种子的胚发育成植株的过程。发芽可体外或体内发生。

[0034] “发芽可能性”可定义为胚完全发芽的能力。短语“不显著降低发芽可能性”是指正常植物将发育的事实。正常植物可定义为能够成功结种的植物。

[0035] “单倍体”植物具有单组(基因组)染色体并且染色体数(n)等于配子的染色体数。

[0036] “分离的胚”是不与种子相关联的胚。这可由于从种子中去除了胚而发生,或者因为胚通过体细胞或配子(小孢子)胚形成来源于其它组织而发生。

[0037] “成熟的”胚是指已经完成了胚形成的胚,其中所述成熟的胚是脱水的并且无代谢活性的。“未成熟的”胚是指从卵细胞分裂发生至胚形成末期的胚。

[0038] 术语“成熟的体细胞胚”是指完全发育的胚,其来源于体细胞组织,具有根尖和茎尖的特征并表现出双极结构。在单子叶植物中,成熟的体细胞胚将具有盾片。

[0039] 术语“培养基”包括液态、气态、或固态的化合物。

[0040] 术语“单子叶植物”和“单子叶的植物”在本文中互换使用。

[0041] 术语“双子叶植物”和“双子叶的植物”在本文中互换使用。

[0042] 如本文所用,术语“植物”包括整个植株、植物器官(例如叶、茎、根等等)、种子和

植物细胞及它们的子代。如本文所用，“植物细胞”包括但不限于种子、悬浮培养物、胚、分生区域、愈伤组织、叶、根、苗、配子体、孢子体、花粉和小孢子。

[0043] 术语“初级体细胞胚”是指起源于除另一个体细胞胚的那些组织之外的组织的体细胞胚。“体细胞胚”是指由体细胞或胚形成细胞通过有丝细胞分裂体外形成的胚。

[0044] “盾片取样”是指切除胚的盾片部分。

[0045] “子叶取样”是指切除胚的子叶部分。

[0046] 术语“体细胞胚形成”是指不具有有性生殖的植物细胞和组织的体外胚形成和发育的过程。

[0047] 在此转向实施例：

[0048] 胚取样允许在植物发育早期的分子表征，允许比其它当前使用的取样方法早上数周、甚至数月来选择期望的基因型。因此，可更早地集中资源于具有发育成期望植株的最高概率的胚。

[0049] 盾片是禾本科 (Poaceae) 家族植物的变型子叶，该家族是单子叶开花植物的一个大家族。它是一种围绕胚轴的盾形状结构并且它具有各种不同的功能。在种子形成期间，盾片起到储存器官的作用，主要积聚脂质，但也积聚蛋白和淀粉。随后在发芽期间，盾片分泌在糊粉层中诱导水解酶产生的激素和有助于胚乳储备消化的酶。此外，盾片也将消化的营养物质从胚乳转运到胚轴。

[0050] 与叶组织相比，盾片具有高细胞密度，并且因此每单位组织具有更多的细胞核，导致具有更高的 DNA 浓度。高密度的 DNA 使盾片组织成为基因组 DNA 提取的优异来源；然而，先前的研究尚未集中于盾片组织作为取样来源，因为认为去除一部分盾片将严重影响胚的发育。

[0051] 本发明提供了分析单子叶植物的胚的方法，其中一片盾片被从分离的胚去除或切除。双子叶植物的分离的胚的子叶也可以相似方式取样。同样地，本发明也提供了分析双子叶植物的胚的方法，其中一片子叶组织被从分离的胚去除或切除。

[0052] 当从分离的胚切除一片盾片或子叶组织时，必须仔细去除组织，而不损伤胚的分生区域。这将允许胚继续发育成正常植物（即，不显著降低胚的发芽可能性），具有最小限度的破坏。

[0053] 本公开的方法还可包括处理取样的胚以保持发芽的可能性。此类处理可一般包括在储存或运输期间的环境条件下，本领域已知的用于保护胚或来源于胚的植株或苗的任何装置。例如，取样的胚在储存或运输期间可用聚合物和 / 或杀真菌剂处理以保护取样的胚。

[0054] 本公开的方法还可包括将标识符附接于包含样品的容器以及包含从中切除样品的分离的胚的容器。这保持了样品和胚的同源性，允许对它们进行正确的追踪，使得样品总是与从其中切除的胚相关联。标识符可为印刷的条形码或标签。

[0055] 在本公开的方法中，样品可从单子叶植物的胚切除或去除，其中所述样品是一片盾片组织。单子叶植物可为，但不限于玉米、高粱、小麦、稻、大麦、燕麦、裸麦、粟、甘蔗、黑小麦、或柳枝稷。

[0056] 分离的胚可获取自种子（即，合子胚形成）或可通过体细胞或配子（小孢子）胚形成“来源于其它组织”。体细胞胚形成涉及由体细胞（即，营养或非配子细胞）产生的胚形成，即分离的体细胞外植体，而配子胚形成涉及由配子细胞（即，小孢子）产生的胚形成。

因为体细胞和配子细胞不是天然的胚形成,此类细胞必须进行诱导以变成胚形成的。可通过外部刺激诸如生长素、细胞分裂素、pH 改变、生长调节剂、和重金属离子来实现胚形成细胞的转化 (Yeung, 1995 :Thorpe TA(ed) In Vitro Embryogenesis in Plants( 第 205-249 页 ;Dodeman 等人 (1997), J. Exp. Bot. 48 :1493-1509。

[0057] 分离的胚必须是活的并且在切除一片盾片或子叶组织 (分别对于单子叶植物和双子叶植物的胚) 后能够发芽成长成植株。分离的胚可为任意倍数性的,其能够存在于本公开的单子叶植物中。例如,分离的胚可为单倍体、二倍体、加倍单倍体、非整倍体、四倍体、六倍体、或八倍体。

[0058] 能够认识到分离的胚可或不可在分离时立即取样。因此,分离的胚在取样前和 / 或取样期间可为新鲜的或冷却的。

[0059] 取样方法本文可用不同的术语称呼 (本文互换使用),诸如例如取样、切除、切片、夹取、削取、切取、剪取、或去除样品。盾片的取样可通过本领域已知的任何装置进行,诸如但不限于:钻头、喷水器、激光、单刀片、一组相对刀片、注射器、芯取样器 (取芯工具)、外科手术刀、小直径的线、小直径的变形钢丝绳、刮刀、和拭子。此外,取样可手动进行或通过自动化方法进行。

[0060] 自动化切除一片盾片或子叶组织可包括以下中的一个或多个步骤:a) 使用自动化的视觉器械确定来自多个分离的胚的一个分离的胚的位置和取向;b) 使用自动化的视觉器械确定一个分离的胚的物理规格 (例如长度、宽度、表面积、厚度、和形状);c) 使用气动式 / 真空抓持或机械 / 物理操纵将分离的胚定向到规定位置之中 / 之上;d) 相对于分离的胚定向切除工具,该定向物理地进行或在激光导向的切除工具情况下经目测进行;e) 通过用于去除样品的工具致动工具或移动分离的胚;f) 将样品和剩余的胚置于独立容器中;g) 跟踪彼此相关的样品和剩余的胚供育种过程使用和选择;h) 清洁和 / 或消毒工具以防止交叉污染或细菌生长;i) 如果不进行清洁和 / 或消毒,销毁工具;j) 将工具片段置于容器中用于直接分析,其中样品位于所述片段之中 / 之上,使得工具片段不干扰提取 (例如用线刮或刺穿分离的胚,随后将其切到实验室平板中用于 DNA 提取);以及 k) 在提取介质中冲洗工具。

[0061] 如果使用小直径的线,该小直径的线的直径可小于 1mm,并且线可为冷的或热的。线也可成型为有利于取样的结构。

[0062] 可使用本领域人员或普通技术人员已知用于切割生物组织的任何激光。在纳秒和皮秒范围内切割的激光适用于本公开的方法。可使用的另一种类型的激光是飞秒激光。飞秒激光具有飞秒域 ( $1\text{fs} = 10^{-15}$ 秒) 内的脉冲宽度,其产生窄的切口并最小化热影响区域,从而避免对被切割的材料的热损伤。

[0063] “样品”本文也可描述为细胞、细胞核、一片、一剪、一薄片、一长条、一份、一部分、一片段、一节段、一切片、或称为单片的任何其它术语,该单片可分离自胚,并且不损伤胚活性或它发育成健康植株的可能性 (即,发芽可能性)。从分离的胚中切除的样品在取样后可为冻干的、新鲜的、冷冻的、或冷却的。

[0064] 从分离的胚中切除的该片盾片组织的尺寸可等于或大于单个细胞核。盾片组织的片也可脱落细胞或小于总盾片的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、



44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%。片的尺寸可为盾片的任何部分,其不引起分离的胚发芽可能性的显著降低。

[0065] 从分离的双子叶植物胚中切除的该子叶组织的尺寸可等于或大于单个细胞核。子叶组织的片也可为脱落细胞或小于子叶组织总量的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%。该片可来自两片子叶中的一个或来自两片子叶。

[0066] 样品可取自盾片的任何区域,并且分离的单子叶植物胚可定位为分生组织向下,其中从分生组织的相对端切除盾片的片。

[0067] 相似地,取样可取自分离的双子叶植物胚的子叶的任何区域。分离的双子叶植物胚可以此种方式定位以避免损伤分生组织。

[0068] 定位可手动进行或利用机械运动、致动等以自动化方式进行。自动化可包括使用机器人、视觉系统、或二者的组合。

[0069] 随后可分析该片盾片或子叶组织的指示遗传性状的一个或多个特性。遗传性状可包括但不限于遗传标记、单核苷酸多态性、简单重复序列、限制性片段长度多态性、单倍型、标签 SNP、遗传标记的等位基因、基因、DNA 来源的序列、RNA 来源的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、微 RNA、siRNA、QTL、卫星标记、转基因、mRNA、ds mRNA、转录模式、甲基化模式、和倍数性水平。

[0070] 可使用本领域技术人员已知的任何 DNA 提取方法从样品中提取 DNA,这将提供足够的 DNA 收率、DNA 质量、PCR 响应、和测序方法响应。这可包括但不限于:Extract N Amp(Sigma-Aldrich)、标准 CTAB 方案、HotShot 方法等等。此外,可在提取后使用本领域技术人员已知的任何扩增方法扩增提取的 DNA。

[0071] 此外,可使用本领域技术人员已知的任何 RNA 提取方法从样品中提取 RNA,这将提供足够的 RNA 收率、RNA 质量、PCR 响应、和测序方法响应。此外,可在提取后使用本领域技术人员已知的任何扩增方法扩增提取的 RNA。

[0072] 可分析提取的核酸是否存在合适的遗传多态性。用于分析遗传多态性的广泛多种遗传标记是可用的并且是本领域的技术人员已知的。如本文所用,遗传标记包括但不限于简单重复序列(SSR)、单核苷酸多态性(SNP)、插入或缺失(插入缺失)、转录模式、和核酸序列。用于分析是否存在遗传标记的核酸分析可作为植物改善或育种程序的一部分用于选择胚。分析可用于选择具有所关注的基因、QTL、等位基因、或单倍型的胚。分析方法是本领域已知的,并且包括但不限于基于 PCR 的检测方法(诸如例如 TaqMan 测定)、微阵列方法、和核酸测序方法。基因、等位基因、QTL、或单倍型也可使用较新型的分子生物学技术来鉴定。

[0073] 利用胚取样的方法

[0074] 本公开的方法使用胚取样来帮助种质改善获得,所述方法包括但不限于:通过仅选择优选的用于加倍的胚来经济化加倍单倍体程序、分析单倍体和加倍单倍体材料的基因

型特点、性状整合和评估、以及标记辅助的育种。

[0075] 加倍单倍体 (DH) 植物向植物育种人员提供一种无价的工具,尤其是用于生成近交系。节省了大量时间,因为纯合系基本上是立即生成的,不需要多代常规育种。

[0076] 然而,本领域熟知的是 DH 制备方法是无效的并且可能是相当劳动密集的。虽然加倍单倍体植株能够天然自发产生,但这是极其稀少的。大多数研究和育种应用依靠人工 DH 制备方法。初始步骤涉及植株的单倍体化,这导致产生包含单倍体种子的群体。非纯合系与诱导亲本杂交,导致单倍体种子产生。具有单倍体胚、但是正常三倍体胚乳的种子进入第二阶段。即,单倍体种子和植株是具有单倍体胚的任何植株,与胚乳的倍数性水平无关。在从群体中选择单倍体种子之后,所选择的种子发生染色体加倍以产生加倍单倍体种子。细胞谱系中自发的染色体加倍将导致正常配子产生或产生来自单倍体细胞谱系的未减数配子。化学化合物诸如秋水仙碱的应用可用于提高二倍体化比率。秋水仙碱结合微管蛋白并防止其聚合成微管,从而在中期止动有丝分裂,并且可用于提高二倍体化比率,即,染色体数的加倍。这些嵌合植株是自花授粉的以产生二倍体(加倍单倍体)种子。这种 DH 种子被栽培并随后进行评估及用于杂交代测交生产。

[0077] 本公开的方法有利于对在单倍体以及加倍单倍体阶段的潜力进行选择。作为加倍单倍体程序的一部分,分离未成熟的单倍体胚,并且单倍体胚随后接触加倍剂诸如秋水仙碱或本领域已知的其它剂。取样可在暴露于加倍剂之前或之后进行。对于前者,在加倍之前取样的胚可被鉴定为基于取样结果的加倍候选。对于后者,一旦加倍阶段已经完成,必须将选择的胚从加倍培养基转移到缺乏加倍剂的培养基中,诸如例如发芽培养基。在这一阶段,移除一片盾片或子叶组织用于分子分析是方便的并且廉价的。本文提供的方法从而允许在加倍单倍体方法早期做出继续进行的决定。

[0078] 本公开的方法可被容易地整合进任何胚挽救方法,其中胚被分离并随后培养。

[0079] 例如,在植物育种中,使用胚挽救技术显著地减少将有益性状从供体亲本转移到具有期望的遗传背景的轮回亲本所花费的时间(Wang 等人,2011.Plant Breeding. 130: 569-573)。该技术涉及在营养培养基上培养未成熟的胚(该培养基可补充或不补充选择剂以筛选转基因外植体)、将来源于其的胚或苗移植到受控生长环境中足够的一段时间、并且随后将苗移植到田间。在耗费资源之前,从未成熟胚移除一片盾片或子叶组织用于分子分析以鉴定将产生具有期望性状的那些胚是方便的并且廉价的。

[0080] 实例

[0081] 本发明将在下面的实例中进一步说明,其中份数和百分比是以重量计并且度数是摄氏度,除非另外指明。应该理解,尽管这些实例说明了本发明的实施例,但仅是以例证的方式给出的。根据上面的论述和这些实例,本领域的技术人员能够探知本发明的基本特征,并且在不脱离其实质和范围的情况下,能够对本发明做出各种变化和修改以使其适用于各种用法和条件。因此,除了那些本文所示和描述的那些之外,根据前文所述,本发明的各种修改形式对本领域的技术人员来说将是显而易见的。这些修改形式也旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0082] 实例 1

[0083] 盾片取样以获得 DNA 用于分子分析(单子叶植物)

[0084] 盾片取样

[0085] 从未成熟胚中切除尺寸为约 2-4mm 的盾片组织,并且随后将其置于培养基上。在提取 DNA 之前,将样品置于冷藏机中至少一周,并且将剩余部分的玉米胚种植在荫棚中。

[0086] DNA 提取和标记测试

[0087] 用镊从培养基中移除样品,并且在 HPLC 水中冲洗,随后拍干。随后将样品置于 96 孔板内的样品管中。未知基因型的叶组织也被加入到 96 孔板内的空样品管中,作为用于比较的装置。两个平行测定板由相同来源的板制成。利用另外的碾磨步骤来确保样品被充分碾磨。两种不同的提取方案被用于每个组织类型,它们是 HotShot DNA 提取方案和 Sbeadex 提取方案。使用 Invader Plus 平台初始测试三十二个 SNP 标记。

[0088] 获得的结果表明从每个盾片样品中提取了足够的 DNA

[0089] 以进行分子标记分析,并且事实上,盾片样品以与相同板上的叶样品相同的“强度”扩增。

[0090] 来源于取样的胚的植株的性能

[0091] 在发芽第一周内的发育延迟;然而,延迟是暂时的,并且在荫棚中盆栽后一周不能被检出。

[0092] 实例 2

[0093] 在用于分子分析的盾片取样和叶取样之间的比较分析

[0094] 使用新的无菌外科手术刀从每个未成熟胚中切除一个盾片组织样品。使用新的无菌棉拭子将样品置于田间板中并且随后置于管中。来自加倍单倍体植株的叶样品也在田间收集并随后冷冻。每个样品提供两个叶穿孔样。

[0095] 两种不同的提取方案被用于每个组织类型,它们是 HotShot DNA 提取方案和 Sbeadex 提取方案。提取的 DNA 利用四十八个生产 SNP 标记运行。一致性在生产标准内,仅具有 0.22% 的浮动(即,不正确的等位基因分型)。此外,叶和盾片样品在低于 5% NF(未发现)的生产标准内进行。杂合子(Hets)与加倍单倍体样品一样评分为不可靠。

[0096] 表 1:标记性能:在盾片和叶样品之间的比较

[0097]

	提取方案	
	Hot Shot	SbeadEx
盾片		
低信号	1.51%	0.27%
%Het	0.10%	0.05%
叶		
低信号	1.20%	0.17%
%Het	0.36%	2.42%

[0098] 实例 3

[0099] 子叶取样(双子叶植物胚)以获得 DNA 用于分子分析

[0100] 从未成熟的小孢子来源的卡诺拉胚中切除子叶组织并且置于培养基上。用镊从培养基中移除样品,并且在 HPLC 水中冲洗,随后拍干。随后将样品置于 96 孔板内的样品管中。未知基因型的叶组织也被加入到 96 孔板内的空样品管中,作为用于比较的装置。两个平行测定板由相同来源的板制成。利用另外的碾磨步骤来确保样品被充分碾磨。两种不同的提取方案被用于每个组织类型,它们是 HotShot DNA 提取方案和 Sbeadex 提取方案。使

用 Invader Plus 平台测试八个 SNP 标记。

[0101] 提取的 DNA (使用 Sbeadex 或 Hotshot 提取方法) 利用八个生产 SNP 标记运行。结果示于表 3 中。Sbeadex 方法导致高 % NF (即, 未发现)。对于小的未成熟胚, Hotshot 提取方法提供略超出可接受范围 (< 5% NF) 的结果, 但是这仍比用叶组织获取的结果更好。“小”样品比“大”样品表现更好。总体来说, 结果表明从每个子叶样品中提取了足够的 DNA 以进行分析标记分析。

[0102] 对于胚的进一步发育, 未观察到非预期的发育事件。

[0103] 表 3 : 使用获取自子叶组织的 DNA 的 SNP 标记分析结果

[0104]

	Hot Shot
来自未成熟胚的小样品	
低信号	4.17%
% Het	0.97%
% NF	5.14%
来自未成熟胚的大样品	
低信号	7.89%
% Het	0.22%
% NF	8.11%
叶	
低信号	6.03%
% Het	0.60%
% NF	6.63%