



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106857232 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710132493.8

(22)申请日 2017.03.07

(66)本国优先权数据

201610717891.1 2016.08.24 CN

(71)申请人 云南大学

地址 650091 云南省昆明市翠湖北路2号

申请人 云南省农业科学院粮食作物研究所

(72)发明人 胡凤益 黄立钰 张石来 黄光福
张静

(74)专利代理机构 北京中政联科专利代理事务
所(普通合伙) 11489

代理人 陈超

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

A01H 1/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法及应用

(57)摘要

本发明公开了利用长雄野生稻(*Oryza longistaminata*)无性繁殖特性固定杂种优势的方法及应用。该方法包括利用长雄野生稻无性繁殖特性培育多年生杂交稻及固定杂种优势。本发明提供的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势方法及应用,实现了杂交稻种植一次通过无性繁殖连续收获多年(多次)的稻作生产方式,固定了稻作杂种优势、降低了稻作生产成本,提高了稻作生产效益。

1. 利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,包括如下步骤:

(I) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻不育系;

(II) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻恢复系;

(III) 利用多年生稻不育系和一年生恢复系、或一年生不育系和多年生稻恢复系、或多年生稻不育系和多年生稻恢复系进行测配,筛选并培育具有多年生性的多年生杂交稻,通过无性繁殖固定杂种优势。

2. 如权利要求1所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中步骤(I)中所述的多年生稻不育系包括多年生稻三系不育系和多年生稻两系不育系。

3. 如权利要求2所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻三系不育系包括以下步骤:

(I-1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一 F_1 代;

(I-2) 将所述第一 F_1 代自交,得到第一 F_2 代;

(I-3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一 F_2 代,其中所述多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;

(I-4) 携带多年生性遗传位点的第一 F_2 代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,所述多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;

(I-5) 利用步骤(I-4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以与杂交稻不育系对应的保持系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至保持系中,获得第二 F_1 代;

(I-6) 所述第二 F_1 代与所述杂交稻不育系对应的保持系做父本进行回交,再自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生稻保持系;

(I-7) 所述多年生稻保持系与其相应的不育系杂交,培育得到携带多年生性遗传位点的多年生稻三系不育系。

4. 如权利要求2所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生两系不育系包括以下步骤:

(I'-1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一 F_1 代;

(I'-2) 将所述第一 F_1 代自交,得到第一 F_2 代;

(I'-3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一 F_2 代,其中所述多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;

(I'-4) 携带多年生性遗传位点的第一 F_2 代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,所述多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;

(I'-5) 利用步骤(I'-4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以两系杂交稻不育系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至两系杂交稻不育系中,获得第三 F_1 代;

(I'-6) 所述第三 F_1 代与所述两系杂交稻不育系做父本在可育环境条件下进行回交,再自交自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生两系杂交稻不育系,所述可育环境条件包括温度和/或日照长度条件。

5. 如权利要求1所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中步骤(II)培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生恢复系包括以下步骤:

(II-1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一 F_1 代;

(II-2) 将所述第一F₁代自交,得到第一F₂代;

(II-3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一F₂代,其中所述多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;

(II-4) 携带多年生性遗传位点的第一F₂代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,所述多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;

(II-5) 利用步骤(II-4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以恢复系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至恢复系中,获得第四F₁代;

(II-6) 所述第四F₁代与所述恢复系做父本进行回交,再自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生稻恢复系。

6. 如权利要求3-5中任一项所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中所述第一栽培稻是RD23。

7. 如权利要求3-5中任一项所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中所述主效位点包括Rh_z2和Rh_z3,所述微效位点包括QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110。

8. 如权利要求3-5中任一项所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中所述具有多年生性状的多年生稻品系携带选自Rh_z2、Rh_z3、QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110的一个或多个多年生性遗传位点。

9. 如权利要求3-5中任一项所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,其中所述第一F₂代连续自交得到的后代材料包括F₃代、F₄代、F₅代、F₆代、F₇代、F₈代、F₉代、F₁₀代、F₁₁代和/或F₁₂代中的一种或多种。

10. 如权利要求1所述的利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法在选育多年生杂交稻及其在杂种优势固定中的应用。

利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于作物杂种优势利用的遗传育种学领域,具体涉及利用长雄野生稻(*Oryza longistaminata*)无性繁殖特性培育多年生杂交稻的方法及其在杂种优势固定中的应用。

背景技术

[0002] 杂种优势现象普遍存在于整个生物界,而杂种优势也被广泛利用于农业、林业、畜牧业等方面,杂交稻的利用大大提高了我国水稻产量,被誉为是第二次绿色科技革命。生产实践证明,在相同条件下,杂交水稻一般比普通良种增产20%左右。解决杂交水稻制种问题的有效途径首推利用雄性不孕性,雄性不孕性在遗传上一般分核质型和胞质型两类,以后者在杂交优势育种中最有利用价值。对于水稻雄性不孕植株,当用某一父本类型与之多次重复杂交,后代仍能保持雄性不孕;而在自由传粉的某些情况下,则产生孕性分离的后代。因而在自由传粉的情况下,不同父本核因子与不孕母本细胞质相互作用的特异性,致使F₁发生不同的孕性分离现象,通过进一步选育,从中获得雄性不孕系,保持系及恢复系,可用作水稻杂种优势育种的材料。1987年,袁隆平院士提出杂交水稻育种分三个发展阶段的战略:育种方法从三系法到两系法再到一系法,朝着程序由繁到简而效率越来越高的方向发展。

[0003] 虽然杂交稻技术对粮食安全具有显著贡献,但由于杂交稻种子只能利用一次,导致生产成本提高。如何利用长雄野生稻以多年生性为主的无性繁殖特性培育多年生杂交稻从而实现杂交稻种植一次收获多年(多次),达到固定杂种优势、降低稻作生产成本、提高稻作生产效益的目的,成为农业科技人员亟待解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明提供了利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,培育多年生杂交稻,实现杂交稻种植一次能够收获多年(多次)的稻作生产方式,进而固定杂种优势、降低稻作生产成本、提高稻作生产效益。

[0005] 本发明通过以下技术方案予以实现:

[0006] 利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的方法,包括如下步骤:

[0007] (I) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻不育系;

[0008] (II) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻恢复系;

[0009] (III) 利用多年生稻不育系和恢复系、或不育系和多年生稻恢复系、或多年生稻不育系和多年生稻恢复系进行测配,筛选并培育具有多年生性的多年生杂交稻。

[0010] 在本发明的一个方面,步骤(I)中所述的多年生稻不育系包括多年生稻三系不育系和多年生稻两系不育系。

[0011] 在本发明的一个方面,步骤(I)培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻三系不育系包括以下步骤:

- [0012] (I-1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一F₁代;
- [0013] (I-2) 将所述第一F₁代自交,得到第一F₂代;
- [0014] (I-3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一F₂代,其中多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;
- [0015] (I-4) 携带多年生性遗传位点的第一F₂代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,所述多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;
- [0016] (I-5) 利用步骤(I-4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以与三系杂交稻不育系对应的保持系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至保持系中,获得第二F₁代;
- [0017] (I-6) 所述第二F₁代与所述保持系做父本进行回交,再自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生稻保持系;
- [0018] (I-7) 所述三系杂交稻多年生稻保持系与其相应的三系杂交稻不育系杂交,培育得到携带多年生性遗传位点的多年生稻不育系。
- [0019] 在本发明的一个方面,步骤(I) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻两系不育系包括以下步骤:
- [0020] (I' -1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一F₁代;
- [0021] (I' -2) 将所述第一F₁代自交,得到第一F₂代;
- [0022] (I' -3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一F₂代,其中所述多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;
- [0023] (I' -4) 携带多年生性遗传位点的第一F₂代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,所述多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;
- [0024] (I' -5) 利用步骤(I' -4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以两系杂交稻不育系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至两系杂交稻不育系中,获得第三F₁代;
- [0025] (I' -6) 所述第三F₁代与所述两系杂交稻不育系做父本在可育环境条件下进行回交,再自交自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生两系杂交稻不育系,所述可育环境条件包括温度和/或日照长度条件。
- [0026] 在本发明的一个方面,步骤(II) 培育携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻恢复系包括以下步骤:
- [0027] (II-1) 以长雄野生稻为父本,以栽培稻为母本进行杂交获得第一F₁代;
- [0028] (II-2) 将第一F₁代自交,得到第一F₂代;
- [0029] (II-3) 筛选出携带多年生性遗传位点的第一F₂代,其中多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点;
- [0030] (II-4) 携带多年生性遗传位点的第一F₂代连续自交得到后代材料,从中选育出多年生稻品系,多年生稻品系携带多年生性遗传位点,即具有多年生性状;
- [0031] (II-5) 利用步骤(II-4)选育出的具有多年生性状的多年生稻品系做供体,以恢复系做母本,通过杂交将多年生性遗传位点导入至恢复系中,获得第四F₁代;
- [0032] (II-6) 第四F₁代与恢复系做父本进行回交,再自交,筛选出携带多年生性遗传位点的多年生稻恢复系。

[0033] 在本发明的一个方面,栽培稻是RD23。

[0034] 在本发明的一个方面,主效位点包括Rh_z2和Rh_z3,微效位点包括QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110。

[0035] 在本发明的一个方面,具有多年生性状的多年生稻品系携带选自Rh_z2、Rh_z3、QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110的一个或多个多年生性遗传位点。

[0036] 在本发明的一个方面,第一F₂代连续自交得到的后代材料包括F₃代、F₄代、F₅代、F₆代、F₇代、F₈代、F₉代、F₁₀代、F₁₁代和/或F₁₂代中的一种或多种。

[0037] 本发明还提供了利用长雄野生稻无性繁殖特性固定稻作杂种优势的方法在选育多年生杂交稻及其在杂种优势固定中的应用。

具体实施方式

[0038] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面结合具体实施方式,对本发明进一步详细说明。应该理解,这些描述只是示例性的,而并非要限制本发明的范围。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。

[0039] 在本发明中,用作父本的是长雄野生稻(*Oryza longistaminata*),其为广泛生长在热带非洲的一个野生种,具有长柱头和花药(Oka,1967)、自交不亲和(Nayar,1968;Chu,1969)、异花授粉(Causse,1991)和地下茎(Porteres,1949;Bezancon,1977;Ghesquiere,1985)特性。在长雄野生稻中,由于地下茎的无性繁殖作用,是发展多年生稻的理想性状,本发明正是基于长雄野生稻的该特性成功培育成多年生稻不育系和/或多年生稻恢复系。

[0040] 在本发明中用作母本的栽培稻可以是包括籼稻和粳稻在内的多数水稻品种,在优选的实施方式中,栽培稻是RD23,其为来自泰国的广泛种植的籼稻品种。

[0041] 在本文中,术语“多年生”,“多年生性”或相似术语是指通过长雄野生稻与栽培稻杂交后代选育的具有种植一次通过无性繁殖可以生长并收获多年(2年及以上)的品系特性,从而具有良好的越冬能力。

[0042] 采用本领域技术人员所熟知的技术,例如但不限于杂交,回交和分子标记辅助选择技术(MAS),以长雄野生稻为父本,栽培稻为母本获得第一F₁代,在优选的实施方式中,第一F₁代是F₁(RD23/*O. longistaminata*)。

[0043] 在本文中,术语“自交”是指来自同一个体的雌雄配子的结合或具有相同基因型个体间的交配或来自同一无性繁殖系的个体间的交配。

[0044] 在本文中,术语“回交”指子一代与两个亲本中的任意一亲本进行杂交,这种方法叫做回交。在育种工作中,常利用回交的方法来加强杂种个体中某一亲本的性状表现。用回交方法所产生的后代称为回交杂种。被用来回交的亲本称为轮回亲本,未被用来回交的亲本称为非轮回亲本。

[0045] 在本发明中,通过对第一F₁代进行自交,得到第一F₂代。在本发明中,还可以包括通过对第一F₁代进行回交,得到BC₁(轮回亲本为母本栽培稻,在优选的实施方式中优选为母本栽培稻RD23)分离群体。

[0046] 对第一F₂代和/或BC₁分离群体进行遗传分析,筛选出多年生性遗传位点,对长雄野生稻的多年生性遗传位点的鉴定和分析可以参见胡凤益所著“长雄野生稻地下茎分子定位

和遗传研究”，西南农业大学2002届硕士论文。在本发明中全文引入该论文作为参考文献。其中多年生性遗传位点包括主效位点和微效位点，具体而言：

[0047] 在本发明中，主效位点包括Rh_z2和Rh_z3，Rh_z2和Rh_z3分别定位在第3染色体上的SSR分子标记OSR16和OSR13之间，其距离分别是1.3cM 和8.1cM，和第4染色体上的SSR分子标记RM119和RM237之间，其距离分别是2.2cM和7.4cM，须说明的是，OSR16等标记名称是本领域技术人员应该都知晓的，属于基于水稻基因组序列公开发布的水稻SSR分子标记术语。

[0048] 如表1所示，在本发明中，微效位点包括QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110。

[0049] 在本发明中所使用的，Rh_z代表地下茎表达主效位点；Q代表微效位点(QTL)；RN：单株地下茎多少；RBD：地下茎分枝程度；RBN：二次分枝程度；RL：地下茎平均长度；RIL：地下茎节间的平均长度；RIN：地下茎节间数；RDW：单株地下茎干重；TN：单株分蘖数；数字代表该位点位于第几号染色体。

[0050] 表1地下茎相关基因/QTLs及性状

[0051]

位点 Loci	染色体 Chr	标记区间 Maker Interval	性状 Trait	LOD	A	P _A	D	D/A
QR11	1	RM306-RM237	RL	3.1	-1.17	0.0024	1.28	-1.09
			RIL	3.4	-0.16	0.0013	0.17	-1.06
Rh _z 2	3	OSR13-OSR16	RBD	12.71	-0.83	0		
			RIL	10.91	-0.53	0		
			TN	6.64	-21.7	0		
QRn3	3	RM282-RM4551	RN	7.11	-1.58	0		
			RBN	8.51	-0.51	0		
			RL	7.78	-3.15	0		
			RIN	12.38	-1.01	0		
Rh _z 3	4	RM119-RM273	RN	3.85	-0.6	0.0975	1.28	-2.13
			RBD	14.39	-0.89	0		
			RBN	8.11	-0.41	0.0001	0.34	-0.83
			RL	13.12	-1.93	0	2.31	-1.2
			RIL	15.58	-0.31	0	0.37	-1.19
			RIN	7.46	-0.66	0.0002	0.58	-0.88
			TN	8.82	-23.5	0	11.78	-0.5
			RDW	2.31	-0.25	0.4181	1.15	-4.6
QRn5	5	RM161-RM421	RN	2.06	-1.03	0.0022		
			RL	2.85	-1.22	0.003		
			RIL	3.38	-0.24	0.0001		
			RIN	3.64	-0.71	0.0001		
			RBD	3.2	-0.33	0.0017	-0.25	0.76
QR16	6	RM30-RM6309	RBD	2.92	-0.48	0.0013		
			RL	2.86	-1.47	0.0004		
			RIL	3.15	-0.25	0.0002		
			TN	4.13	-17.3	0.0001		
QR17	7	RM336-RM234	RBD	2.77	-0.31	0.0004		

			RL	3.51	-1.46	0.0002			
			RIL	3.74	-0.23	0.0001			
[0052]	QRn10	10	RM271-RM269	RN	3.74	-1.2	0.0001	-0.65	0.54
				RL	4.34	-1.59	0	-0.8	0.5
				RIL	5.22	-0.24	0	-0.14	0.58
				RIN	3.81	-0.61	0		
				RDW	2.12	-0.92	0.0035		
QRbd2	2	RM71-RM300	RBD	4.21	-0.39	0			
			RDW	3.66	-1.3	0.0001	-0.75	0.58	
QRn6	6	RM345-OSR21	RN	2.5	-1.11	0.0018			
			RIN	5.51	-0.86	0	-0.61	0.71	
QRn2	2	RM341-RM327	RN	4.09	-1.55	0	-1	0.65	
QRn7	7	RM125-RM180	RN	3.46	-1.03	0.0006	0.75	-0.73	

[0053] 在本发明中,将携带多年生性遗传位点的第一F₂代自交获得包括F₃代、F₄代、F₅代、F₆代、F₇代、F₈代、F₉代、F₁₀代、F₁₁代和/或F₁₂代中的一种或多种后代材料,基因组基本稳定纯合形成株系,从而可以用作携带多年生性遗传位点的第一多年生稻品系,其中第一多年生稻品系根据品系基因型(携带不同多年生遗传位点)和表现型的不同可以包括一种或多种品系,可以根据需要选择任一种多年生稻品系进行育种。在本发明中优选使用的第一多年生稻品系是采用分子标记辅助选择培育的具有多年生性状的品系,如本发明中的PR23、PR24等品系,即多年生稻23号,多年生稻24号,根据英文Perennial Rice 23, Perennial Rice 24命名,在优选的实施方式中,不同品系携带不同遗传位点并打破了地下茎(即无性繁殖特性或多年生性)与不育基因的连锁。此处的地下茎与不育基因的连锁是指由于长雄野生稻存在不育基因或半不育基因以及具有自交不亲和基因,而不育性状与地下茎性状存在一定的连锁关系,所以要选择带有地下茎(多年生性)的植株,通常也是不育的,只有打破它们基因之间的连锁,才能真正用于育种,获得多年生稻,保证产量,例如PR24携带了多年生性遗传位点Rh2 (Chr3)、Rh3 (Chr4)、QRn2 (Chr2)、QRbd2 (Chr2)、QRn7 (Chr7)、QRn10 (Chr10),可以实现多年生性。

[0054] 在本发明中,将上述具有不同多年生性遗传位点的多年生稻品系为供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,以与三系杂交稻不育系对应的三系杂交稻保持系做母本,通过杂交方法将多年生性遗传位点导入至三系杂交稻保持系中,再转至不育系中。

[0055] 在本发明中,将上述具有不同多年生性遗传位点的多年生稻品系为供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,以与两系杂交稻不育系做母本,通过杂交方法将多年生性遗传位点导入至两系杂交稻不育系中。

[0056] 在本发明中,将上述具有不同多年生性遗传位点的多年生稻品系为供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,以恢复系做母本,通过杂交方法将多年生性遗传位点导入至恢复系中。

[0057] 目前本领域中研究及生产常用的不育系,例如野败型雄性不育系、籼型雄性不育系培矮64S,包括三系配套、两系配套中的不育系均可以用于本发明,保持系与不育系是对应关系(三系配套)或两系合一(光温敏型不育系)(两系配套);恢复系是与不育系杂交,可以恢复不育系育性并且F₁代植株具有显著杂种优势的品系(种)。

[0058] 在本发明中可以使用的三系杂交稻包括本领域中已知的三系水稻,例如不育系(如珍汕97A)、保持系(珍汕97B)、恢复系(蜀恢527),本发明中优选使用的是云南大学提供

的三系水稻,即不育系芽1A、保持系芽1B和恢复系R2066。

[0059] 在本发明中可以使用的两系杂交稻包括本领域中已知的两系水稻,例如光温敏核不育系培矮64S、恢复系9311,本发明中优选使用的是华中农业大学提供的两系水稻不育系,即光温敏核不育系华1015S。

[0060] 在本发明中采用MAS技术,MAS技术即分子标记辅助选择(MolecularMarker-Assisted Selection MAS)是利用与目标性状基因紧密连锁的分子标记进行间接选择,是对目标性状在DNA水平的选择,不受环境影响,不受等位基因显隐性关系干扰,选择结果可靠,同时又可避免等位基因间显隐性关系的干扰,从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良;分子标记辅助选择育种具有标记基因型鉴定可以在低世代和植株生长的任何阶段进行、共显性的分子标记允许在杂合体阶段进行鉴定隐性基因、对目的基因的选择不受基因表达和环境条件的影响等优点。分子标记辅助选择育种是将分子标记应用于作物改良的一种手段,其基本原理是利用与目标基因紧密连锁或表现共分离的分子标记对选择个体进行目标以及全基因组筛选,从而减少连锁累赘,获得期望的个体,达到提高育种效率的目的。

[0061] MAS根据分子标记的不同,如常用的有SSR标记、SNP标记、CAPS标记等,但原理和步骤基本相同,虽然操作方式会有差异,在本领域中有大量的相关文章和书籍,在育种领域已经成为很常用的技术,为本领域技术人员所熟知。基本步骤包括DNA提取、PCR标记的扩增、凝胶电泳、和/或结果(带型)分析。

[0062] 本发明参考Temnykh等(2000年)的DNA提取方法,对各株系的代表单株分别提取基因组DNA。

[0063] 对多年生性遗传位点紧密连锁多态的SSR标记进行各单株基因组DNA为模板的聚合酶链式反应(PCR)。

[0064] PCR反应的产物通过8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,银染后,参考双亲的扩增条带,对带型进行判别记录,筛选目的基因型单株。

[0065] 在本发明中,用多年生稻品系做供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,三系杂交稻保持系做受体获得的第二F₁代,在优选实施方式中,第二F₁代是F₁(三系杂交稻保持系/PR24)。第二F₁代与三系杂交稻保持系母本进行回交和/或自交,每代都通过相应遗传位点紧密连锁分子标记(SSR标记,表1)进行遗传位点的追踪与鉴定,筛选获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的三系杂交稻多年生保持系。此处,回交目的是遗传背景的清除,利用MAS留下需要的性状,其它则和轮回亲本一致。因此,在本发明中第二F₁代与三系杂交稻保持系母本进行回交和/或自交的先后顺序以及重复次数没有特别限制,只要最终能筛选出获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的第一多年生保持系。其中,在优选的实施方式中,进行回交1次,或者连续回交2次、3次、4次或更多次;在优选的实施方式中,进行自交1次,或者连续自交2次、3次、4次或更多次。在优选的实施方式中,单次或连续的回交和单次或连续的自交可以交替进行。

[0066] 在本发明中,遗传位点的追踪与鉴定是MAS过程,从而获得带有长雄野生稻多年生性(无性繁殖特性)遗传位点的单株。

[0067] 将三系杂交稻多年生保持系与其相应的三系杂交稻不育系杂交,培育得到携带多年生性遗传位点的多年生稻不育系。

[0068] 在本发明中,用多年生稻品系做供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,两系杂交稻不育系做受体获得的第三F₁代,在优选实施方式中,第三F₁代是F₁(两系杂交稻不育系/PR24)。第三F₁代与两系杂交稻不育系母本在可育环境条件下进行回交和/或自交,每代都通过相应遗传位点紧密连锁分子标记(SSR标记进行回交和/或自交,每代都通过相应遗传位点紧密连锁分子标记(SSR标记,表1)进行遗传位点的追踪与鉴定,筛选获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的两系杂交稻多年生稻不育系,可育环境条件包括温度、日照长度等条件。此处,回交目的是遗传背景的清除,利用MAS留下需要的性状,其它则和轮回亲本一致。因此,在本发明中第三F₁代与两系杂交稻不育系对应可育期植株母本进行回交和/或自交的先后顺序以及重复次数没有特别限制,只要最终能筛选出获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的两系杂交稻多年生稻不育系。其中,在优选的实施方式中,进行回交1次,或者连续回交2次、3次、4次或更多次;在优选的实施方式中,进行自交1次,或者连续自交2次、3次、4次或更多次。在优选的实施方式中,单次或连续的回交和单次或连续的自交可以交替进行。

[0069] 在本发明中,用多年生稻品系做供体,在优选实施方式中以PR23和/或PR24多年生稻品系作为供体,恢复系做受体获得的第四F₁代,在优选实施方式中,第四F₁代是F₁(恢复系/PR24)。第四F₁代与恢复系母本进行回交和/或自交,每代都通过相应遗传位点紧密连锁分子标记(SSR标记,表1)进行遗传位点的追踪与鉴定,筛选获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻恢复系。此处,回交目的是遗传背景的清除,利用MAS留下需要的性状,其它则和轮回亲本一致。因此,在本发明中第四F₁代与恢复系母本进行回交和/或自交的先后顺序以及重复次数没有特别限制,只要最终能筛选出获得携带长雄野生稻多年生性遗传位点的多年生稻恢复系。其中,在优选的实施方式中,进行回交1次,或者连续回交2次、3次、4次或更多次;在优选的实施方式中,进行自交1次,或者连续自交2次、3次、4次或更多次。在优选的实施方式中,单次或连续的回交和单次或连续的自交可以交替进行。

[0070] 在本发明中,遗传位点的追踪与鉴定是MAS过程,从而获得带有长雄野生稻多年生性(无性繁殖特性)遗传位点的单株。

[0071] 在本发明中,培育通过以下三种方式得到多年生杂交稻组合:

[0072] 方式一:以恢复系为父本,与本发明的多年生稻不育系进行杂交测配,获得多年生杂交稻组合。

[0073] 方式二:以本发明的多年生稻恢复系为父本,与不育系杂交测配,获得多年生杂交稻组合。

[0074] 方式三:以本发明的多年生稻恢复系为父本,与本发明的多年生稻不育系杂交测配,获得多年生杂交稻组合。

[0075] 本文中使用的术语“杂交测配”是指杂交水稻配组测交获得杂交种子,是杂交育种的前提,可用来测定亲本配合力和恢复系对不育系的育性恢复能力,是用来评定一个亲本材料在杂种优势利用或杂交育种中的利用价值的试验方式,进行测配的步骤为本领域技术人员所熟知。

[0076] 本发明通过在不育系和/或恢复系中引入长雄野生稻中控制无性繁殖特性(多年生性)的遗传位点,培育多年生杂交稻,实现了杂交稻种植一次可连续收获多年(多次)的稻作生产方式,达到了利用长雄野生稻无性繁殖特性固定稻作杂种优势的目的,降低了稻作

生产成本,提高了稻作生产效益。

[0077] 本发明提供的方法可以指导其他作物杂种优势固定(例如玉米、小麦等作物),对保障粮食安全及保持生态安全具有十分重要的战略意义。

[0078] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0079] 实施例

[0080] 实验材料与方法

[0081] 实验材料包括以下

[0082] 长雄野生稻:从尼日尔收集,由日本物理与化学研究所的HiroshiHyakutake博士友好提供;

[0083] 栽培稻RD23:来自泰国广泛种植的籼稻品种;

[0084] 三系杂交稻不育系芽1A:由云南大学提供;

[0085] 三系杂交稻保持系芽1B:由云南大学提供;

[0086] 两系杂交稻不育系1015S:由华中农业大学提供;

[0087] 恢复系R2066:由云南大学提供。

[0088] 杂交方法在本领域中广泛已知,完全在本领域技术人员的能力范围之内,具体可以参考《作物育种学》—中国农业大学出版社。

[0089] 分子标记辅助选择(MAS)及多年生性遗传位点的分子标记检测参考Temnykh等(2000年)的DNA提取方法,对各株系的代表单株分别提取基因组DNA。对多年生性遗传位点紧密连锁多态的SSR标记进行各单株基因组DNA为模板的聚合酶链式反应(PCR)。PCR反应的产物通过8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,银染后,参考双亲的扩增条带,对带型进行判别记录,筛选目的基因型单株。

[0090] 本案例所涉及材料与方法,如无特殊说明,均为常规材料与方法。

[0091] 实施例1F₁(RD23/0.longistaminata)代的培育

[0092] 以RD23为母本去雄后,长雄野生稻为父本直接授粉后通过幼胚挽救获得到F₁(RD23/0.longistaminata)植株,其开花时期表现出花药不开裂,具有约30%左右的花粉育性、地下茎表现介于父本和母本之间。

[0093] 实施例2多年生稻品系PR24的培育

[0094] 种植实施例1中所获得的F₁(RD23/0.longistaminata)代,通过对F₁植株进行强制自交授粉获得了F₂代种子,这些种子用1/4MS培养基(3%蔗糖+0.7%琼脂,pH值5.8)进行胚培养获得株苗,通过练苗后移栽种植,最终获得分离的F₂单株进行筛选。

[0095] 利用选自Rh_z2和Rh_z3中的一个或多个主效位点,选自QR11、QRbd2、QRn2、QRn3、QRn5、QRn6、QR16、QRn7、QR17和QR110中的一个或多个微效位点对分离的F₂单株进行筛选,选育出多年生稻品系PR24(Perennial Rice 24,PR24),经分子检测,该品系携带了来自长雄野生稻多年生性遗传位点Rh_z2(Chr3)、Rh_z3(Chr4)、QRn2(Chr2)、QRbd2(Chr2)、QRn7(Chr7)、QRn10(Chr10)(表2),经过水稻生产实践证实,其产量表现稳定,农艺性状优良,具有很好的多年生性。

[0096] 表2列出了在实施例中所使用的品系的基因型。

[0097] 表2所用品系基因型列表

品系名称	多年生性遗传位点(染色体)					
	<i>QRn2</i> (Chr2) RM327	<i>QRbd2</i> (Chr2) RM438	<i>Rhz2</i> (Chr3) Rhz-7	<i>Rhz3</i> (Chr4) Rhz-73	<i>QRn7</i> (Chr7) RM125	<i>QRn10</i> (Chr10) RM271
RD23	aa	bb	cc	dd	ee	ff
F ₁ (RD23/ <i>O. longistamina</i>)	Aa	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff
<i>O. longistaminata</i>	AA	BB	CC	DD	EE	FF
PR24	AA	BB	CC	DD	EE	FF
芽1B	aa	bb	cc	dd	ee	ff
PR芽1B	AA	BB	CC	DD	EE	FF
芽1A	aa	bb	cc	dd	ee	ff
PR芽1A	AA	BB	CC	DD	EE	FF
华1015S	aa	bb	cc	dd	ee	ff
PR华1015S	AA	BB	CC	DD	EE	FF
R2066	aa	bb	cc	dd	ee	ff
PRR2066	AA	BB	CC	DD	EE	FF
PR芽R2066-1	Aa	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff
PR芽R2066-2	Aa	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff
PR芽R2066-3	AA	BB	CC	DD	EE	FF

[0099] 注:A为母本带型,B为父本带型,H为杂合带型,Rhz代表地下茎表达主效位点;Q代表微效位点(QTL);Rn代表单株地下茎个数多少;Rbd:地下茎分枝程度;Rl:地下茎平均长度;数字代表该位点位于第几号染色体。

[0100] 实施例3多年生稻不育系(三系)的培育

[0101] 以三系杂交稻保持系芽1B为母本进行人工去雄,以多年生稻PR24为父本进行杂交获得F₁(三系杂交稻保持系(芽1B)/PR24)代。

[0102] 用F₁(三系杂交稻保持系(芽1B)/PR24)代和三系杂交稻保持系1B进行回交4次,然后连续自交4次。在回交和自交过程中利用基于SSR的分子标记辅助选择(Molecular Marker-Assisted Selection,MAS)育种技术,对多年生性位点Rhz2(Chr3)、Rhz3(Chr4)、QRn2(Chr2)、QRbd2(Chr2)、QRn7(Chr7)、QRn10(Chr10)进行检测,选择携带这些位点的植株进行进一步的回交、自交,直至纯合稳定,获得多年生稻保持系,命名为Perennial Rice芽1B,即PR芽1B(表2)。

[0103] 用三系杂交稻多年生稻保持系PR芽1B与相应的三系杂交稻不育系芽1A进行杂交,对产生的F₁植株进行花粉育性鉴定及自交结实率考查,以检测其对不育性的保持能力,标准为花粉育性与不育系芽1A一致,而自交结实率为零。

[0104] 在上述检测过程中,利用MAS筛选连续多代选择携带来自长雄野生稻的多年生性遗传位点和花粉完全败育的单株,最终获得具有多年生稻不育系,命名为PR芽1A(表2)。

[0105] 实施例4多年生稻不育系(三系)田间评价

[0106] 将三系杂交稻多年生稻不育系PR芽1A、三系杂交稻多年生稻保持系PR芽1B在景洪试验田进行多年生性、育性评价,供体多年生稻PR24和受体三系杂交稻不育系芽1A、三系杂交稻保持系芽1B作为对照在景洪试验田进行同田种植,经过2年4季的田间试验,结果如下表(表4)所示:

[0107] 表3多年生稻不育系(三系)田间评价结果

品种(组合)名称	第一季 单株有效穗 (个)	第二季 单株有效穗 (个)	第三季 单株有效穗 (个)	第四季 单株有效穗 (个)
[0108] 芽 1B	12.4	2.3	0	0
PR 芽 1B	11.5	12.7	12.2	11.9
芽 1A	10.2	1.8	0	0
PR 芽 1A	9.8	8.8	10.6	9.5
多年生稻 PR24	16.6	17.2	15.8	16.8

[0109] 注：第一季为第一年早稻，第二季为第一年晚稻，第三季为第二年早稻，第四季为第二年晚稻。

[0110] 由上表可知：多年生稻不育系可以实现多年生，实现通过无性繁殖方式保存和繁殖多年生稻不育系。

[0111] 实施例5多年生稻不育系(两系)的培育

[0112] 以水稻光温敏核不育系-华1015S为母本进行人工去雄，以多年生稻PR24为父本进行杂交获得F₁(华1015S/PR24)代。

[0113] 用F₁(华1015S/PR24)代和华1015S进行回交4次，然后连续自交4次。在回交和自交过程中利用基于SSR的分子标记辅助选择(MolecularMarker-Assisted Selection, MAS)育种技术，对多年生性位点Rh2(Chr3)、Rh3(Chr4)、QRn2(Chr2)、QRbd2(Chr2)、QRn7(Chr7)、QRn10(Chr10)进行检测，选择携带这些位点的植株进行进一步的回交、自交，直至纯合稳定，获得多年生稻不育系，命名为Perennial Rice华1015S，即PR华1015S(表2)。

[0114] 注：以上试验在保山市施甸县试验田进行(华1015S在保山市低温环境下可育，在景洪表现不育特性)；光温敏核不育系如华1015S是籼型光温敏核不育系，育性主要受温度影响，即具有在低温(<23℃)可育，在高温条件下不育特性，因此，低温下其正常可育自交结实，可以进行种质材料繁种和保存，达到了不育系和保持系两系合一的目的，加上恢复系即组成了两系杂交稻。

[0115] 实施例6多年生稻不育系(两系)田间评价

[0116] 将两系杂交稻多年生稻不育系PR华1015S在景洪和保山市施甸县试验田进行多年生性、育性评价，供体多年生稻PR24和受体华1015S作为对照进行同田种植，经过2年4季的田间试验，结果如下表(表4)所示：

[0117] 表4多年生稻不育系(两系)田间评价结果

品种名称	第一季 单株有效穗 (个)	第二季 单株有效穗 (个)	第三季 单株有效穗 (个)	第四季 单株有效穗 (个)
[0118] PR 华 1015S	11.8	12.6	10.6	11.5
华 1015S	10.9	1.7	0	0
多年生稻 PR24	16.6	17.2	15.8	16.8

[0119] 注：第一季为第一年早稻，第二季为第一年晚稻，第三季为第二年早稻，第四季为第二年晚稻。

[0120] 由上表可知：多年生稻不育系可以实现多年生，实现通过无性繁殖方式保存保存和繁殖多年生稻不育系。

[0121] 实施例7多年生稻恢复系的培育

[0122] 以杂交稻恢复系R2066为母本进行人工去雄,以多年生稻PR24为父本进行杂交获得F₁(恢复系R2066/PR24)代。

[0123] 用F₁(恢复系R2066/PR24)代和恢复系R2066进行回交4次,然后连续自交4次。在回交和自交过程中利用基于SSR的分子标记辅助选择(Molecular Marker-Assisted Selection, MAS)育种技术,对多年生性位点Rh2(Chr3)、Rh3(Chr4)、QRn2(Chr2)、QRbd2(Chr2)、QRn7(Chr7)、QRn10(Chr10)进行检测,选择携带这些位点的植株进行进一步的回交、自交,直至纯合稳定,获得多年生稻恢复系,命名为Perennial Rice R2066,即PRR2066(表2)。

[0124] 实施例8多年生稻恢复系田间评价

[0125] (1) 多年生稻恢复系与不育系杂交试验

[0126] 将多年生稻恢复系PRR2066与三系杂交稻不育系芽1A进行田间杂交制种,结果显示,PRR2066可以恢复三系杂交稻不育系芽1A的育性获得杂交种。

[0127] (2) 多年生稻恢复系多年生性试验

[0128] 将多年生恢复系PRR2066在景洪试验田进行多年生性评价和杂交稻制种试验,供体多年生稻PR24作为对照在景洪试验田进行同田种植,经过2年4季的田间试验,结果如下表(表5)所示:

[0129] 表5多年生稻恢复系多年生性试验结果

品种(组合)名称	第一季 单株有效穗 (个)	第二季 单株有效穗 (个)	第三季 单株有效穗 (个)	第四季 单株有效穗 (个)
R2066	14.7	2.4	0	0
PRR2066	15.3	16.8	16.6	17.1
多年生稻 PR24	16.6	17.2	15.8	16.8

[0131] 注:第一季为第一年早稻,第二季为第一年晚稻,第三季为第二年早稻,第四季为第二年晚稻

[0132] 由上述结果可知:1.多年生稻恢复系PRR2066可以恢复不育系芽1A的育性;2.多年生稻恢复系PRR2066可以实现多年生性。

[0133] 实施例9多年生杂交稻的培育

[0134] 方式一:以杂交稻恢复系R2066为父本,与实施例3的多年生稻不育系PR芽1A进行杂交测配,获得多年生杂交稻组合PR芽R2066-1。

[0135] 方式二:以实施例7的多年生稻恢复系PRR2066为父本,与不育系芽1A杂交测配,获得多年生杂交稻组合PR芽R2066-2。

[0136] 方式三:以实施例7的多年生稻恢复系PRR2066为父本,与实施例3的多年生稻不育系PR芽1A杂交测配,获得多年生杂交稻组合PR芽R2066-3。

[0137] 实施例10多年生杂交稻生产评价

[0138] 将多年生杂交组合在景洪试验田进行多年生性、杂种优势评价,供体多年生稻PR24和恢复系作为对照在景洪试验田进行同田种植,经过2年4季的田间试验,结果如下表(表6)所示:

[0139] 表6多年生杂交稻田间试验评价结果

品种(组合) 名称	第一季产量 (公斤/亩)	第二季产量 (公斤/亩)	第三季产量 (公斤/亩)	第四季产量 (公斤/亩)
PR 芽 R2066-1	653	603	635	602
PR 芽 R2066-2	684	613	685	628
PR 芽 R2066-3	675	627	656	618
多年生稻 PR24	521	517	532	508
PRR2066	502	476	498	458
R2066	495	0	0	0

[0140] 注：第一季为第一年早稻，第二季为第一年晚稻，第三季为第二年早稻，第四季为第二年晚稻

[0141] 由上表可知：1. 多年生杂交稻可以实现种植一次通过无性繁殖可以连续收获2年共4次，具有多年生性；2. 多年生杂交稻，在不同年份相同季节产量相当，固定了杂种优势。由此可见，多年生杂交稻可以实现种植一次通过无性繁殖连续多年(多季)生产，达到利用长雄野生稻无性繁殖特性固定杂种优势的目的。

[0142] 应当理解的是，本发明的上述具体实施方式仅仅用于示例性说明或解释本发明的原理，而不构成对本发明的限制。因此，在不偏离本发明的精神和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。此外，本发明所附权利要求旨在涵盖落入所附权利要求范围和边界、或者这种范围和边界的等同形式内的全部变化和修改例。