



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107333642 A

(43)申请公布日 2017. 11. 10

(21)申请号 201710520596.1

(22)申请日 2017.06.30

(71)申请人 重庆师范大学

地址 401331 重庆市沙坪坝区天陈路12号

(72)发明人 赵正武

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 周建军

(51) Int. Cl.

A01H 1/02(2006.01)

A01H 1/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种耐冷水稻的分子育种方法

(57)摘要

本发明提供一种耐冷水稻的分子育种方法,包括如下步骤:(1)以水稻恢复系为母本,以耐冷性水稻品系为父本,杂交获得F₁种子;(2)以水稻恢复系为轮回亲本与杂交F₁回交,获得回交一代群体BC₁种子;(3)培育BC₁种子;(4)从BC₁株系中筛选出含有耐冷基因的株系,将所述株系与水稻恢复系回交,再自交,获得含有耐冷基因的水稻品系。本发明利用优异水稻耐冷资源,挖掘新基因,采用回交群体耐冷材料逐级分子筛选,并且,可以对耐冷材料及其杂交后代耐冷性的表型进行鉴定,实现耐冷基因高效转移,从而创制出耐冷水稻新材料。



1. 一种耐冷水稻的分子育种方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 以水稻恢复系为母本,以耐冷性水稻品系为父本,杂交,获得杂交F₁种子;
- (2) 以所述水稻恢复系为轮回亲本与杂交F₁回交,获得回交一代群体BC₁种子;
- (3) 培育BC₁种子;

(4) 从BC₁株系中筛选出含有耐冷基因的株系,将所述株系与水稻恢复系回交,再自交,获得含有耐冷基因的水稻品系。

2. 根据权利要求1所述的分子育种方法,其特征在于:所述杂交F₁种子与水稻恢复系回交4-6代后,再进行自交;优选地,所述杂交F₁种子与水稻恢复系回交4代后,再进行自交。

3. 根据权利要求1所述的分子育种方法,其特征在于:步骤(4)中,将回交得到的水稻品系自交2-4代,获得含有耐冷基因的水稻品系;优选地,将回交得到的水稻品系自交2代,获得含有耐冷基因的水稻品系。

4. 根据权利要求1所述的分子育种方法,其特征在于:所述水稻恢复系选自蜀恢527;和/或,所述耐冷性水稻品系选自糯稻89-1。

5. 根据权利要求1所述的分子育种方法,其特征在于:步骤(4)中,在BC₁的稻苗分蘖期,以所述耐冷性水稻品系为对照,利用耐冷基因连锁标记对回交一代群体表型与水稻恢复系相似的单株进行分子标记比对检测,筛选出含有耐冷基因连锁标记的株系,将所述株系与水稻恢复系回交,再自交,对每个世代的株系逐级比对筛选,获得含有耐冷基因的水稻品系。

6. 根据权利要求5所述的分子育种方法,其特征在于:步骤(4)中,分别提取所述耐冷性水稻品系和回交株系的基因组总DNA,分别以与耐冷基因POG-2、qPOG-3和qPOG-7紧密连锁的分子标记RM418、RM7110、RM218、RM232、RM5958、RM250为引物,进行PCR扩增,对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,以所述耐冷性水稻品系为对照,对每个世代的株系逐级比对筛选,筛选出与对照分子标记一致的株系。

7. 根据权利要求6所述的分子育种方法,其特征在于:正向引物RM418序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物RM418序列如SEQ ID NO.2所示;

和/或,正向引物RM7110序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物RM7110序列如SEQ ID NO.4所示;

和/或,正向引物RM218序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物RM218序列如SEQ ID NO.6所示;

和/或,正向引物RM232序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物RM232序列如SEQ ID NO.8所示;

和/或,正向引物RM5958序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物RM5958序列如SEQ ID NO.10所示;

和/或,正向引物RM250序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物RM250序列如SEQ ID NO.12所示;

和/或,PCR反应体系为25 μ L,包括10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10mM dNTP 0.5 μ L、5U/ μ L Taq酶0.25 μ L、引物2.0 μ L、DNA模板2.0 μ L、ddH₂O 17.75 μ L;

和/或,PCR的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,共35个循环,然后25 $^{\circ}$ C 10min。

8. 根据权利要求1所述的分子育种方法,其特征在于:步骤(4)中,通过芽期耐冷性鉴定和/或幼苗期耐冷性鉴定,筛选获得耐冷水稻品系。

9. 一种耐冷水稻的分子标记检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

a) 分别提取耐冷性水稻和待测水稻的基因组总DNA;

b) 分别以与耐冷基因POG-2、qPOG-3和qPOG-7紧密连锁的分子标记RM250、RM5958、RM218、RM232、RM418和RM7110为引物,进行PCR扩增,对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,以所述耐冷性水稻为对照,若待测水稻与对照分子标记一致,表明耐冷基因的存在。

10. 根据权利要求9所述的分子标记检测方法,其特征在于,正向引物RM418序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物RM418序列如SEQ ID NO.2所示;

和/或,正向引物RM7110序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物RM7110序列如SEQ ID NO.4所示;

和/或,正向引物RM218序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物RM218序列如SEQ ID NO.6所示;

和/或,正向引物RM232序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物RM232序列如SEQ ID NO.8所示;

和/或,正向引物RM5958序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物RM5958序列如SEQ ID NO.10所示;

和/或,正向引物RM250序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物RM250序列如SEQ ID NO.12所示;

和/或,PCR反应体系为25 μ L,包括10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10mM dNTP 0.5 μ L、5U/ μ L Taq酶0.25 μ L、引物2.0 μ L、DNA模板2.0 μ L、ddH₂O 17.75 μ L;

和/或,PCR的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,共35个循环,然后25 $^{\circ}$ C 10min。

一种耐冷水稻的分子育种方法

技术领域

[0001] 本发明涉及水稻种植领域,特别是涉及一种耐冷水稻的分子育种方法。

背景技术

[0002] 水稻低温冷害在很多国家都普遍存在,全球有20多个国家存在严重的水稻低温冷害问题,受到低温冷害威胁的水稻面积超过1500万 hm^2 。中国的东北稻区低温冷害较为严重,在中国南方,水稻前期受低温影响,易造成烂种、烂秧、死苗,后期遇低温影响正常抽穗结实,在中国,每年因低温冷害使稻谷减产30-50亿 kg 。因水稻低温冷害分布广危害大,危害水稻各生育时期,成为了水稻育种研究热点,引起了世界各国水稻育种专家和研究单位的重视。

[0003] 选育和推广耐低温品种是减少低温冷害损失最经济有效的方法。但目前生产上大面积应用的杂交稻品种耐低温能力普遍偏较差,严重影响了杂交稻增产潜力的发挥。究其原因,主要是水稻耐冷资源缺乏,难以育成耐冷性强的水稻新品种。资源材料是育种之母,多年的育种实践已经证明,狭窄的遗传基础已成为水稻耐冷育种难以取得突破的“瓶颈”,加速水稻耐冷材料的创制是解决“瓶颈”的关键。生命科学的发展日新月异,一些发达国家利用其拥有的技术和资金优势,将优异耐冷水稻种质的发掘和利用作为种质创新重点,以便为水稻耐冷育种提供材料保障。纵观我国水稻育种历史和现状,矮化育种和三系、两系杂交水稻的突破,无一不是源于新种质的发现和应用。换句话说,一批新耐冷材料的育成,必将有一批耐冷优良新品种诞生,水稻生产也随之跃上一个新台阶。因此,加快稻种耐冷资源的引进和评价,加强有利基因的导入,发掘和创造新的优异耐冷种质和育种中间材料,强化新的耐冷基因的挖掘及应用,创制耐冷新材料,才能提高育成新品种的耐低温能力。

[0004] 创制水稻新材料的方法很多,利用耐冷水稻资源,采用传统的杂交技术,通过杂交后代的选择,可获得耐冷材料,因不能克服生殖隔离,运用远缘杂交技术创制优异耐冷新材料难度较大,物理诱变育种技术,化学药品处理创造新的突变体也可获得耐冷水稻新材料,近年来,随着分子生物技术的发展,转基因技术和分子标记辅助选择技术等已成为创制耐冷水稻新材料的新方法,并在水稻耐冷材料创制和耐冷品种选择取得了成功,不管采用什么方法,创制新材料,丰富耐冷资源,克服自然耐冷水稻资源匮乏难点,选育耐冷新品种,才是减少低温冷害的关键。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种耐冷水稻的分子育种方法,用于解决现有技术中水稻的耐冷性差等问题。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种耐冷水稻的分子育种方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 以水稻恢复系为母本,以耐冷性水稻品系为父本,杂交,获得杂交 F_1 种子;

[0008] (2) 以所述水稻恢复系为轮回亲本与杂交 F_1 回交,获得回交一代群体 BC_1 种子;

- [0009] (3) 培育BC₁种子;
- [0010] (4) 从BC₁株系中筛选出含有耐冷基因的株系,将所述株系与水稻恢复系回交,再自交,获得含有耐冷基因的水稻品系。
- [0011] 在本发明的一些实施例中,所述杂交F₁种子与水稻恢复系回交4-6代后,再进行自交。
- [0012] 在本发明的一些实施例中,所述杂交F₁种子与水稻恢复系回交4代后,再进行自交。
- [0013] 在本发明的一些实施例中,步骤(4)中,将回交得到的水稻品系自交2-4代,获得含有耐冷基因的水稻品系。
- [0014] 在本发明的一些实施例中,步骤(4)中,将回交得到的水稻品系自交2代,获得含有耐冷基因的水稻品系。
- [0015] 在本发明的一些实施例中,所述水稻恢复系选自蜀恢527。
- [0016] 在本发明的一些实施例中,所述耐冷性水稻品系选自糯稻89-1。
- [0017] 在本发明的一些实施例中,步骤(4)中,在BC₁的稻苗分蘖期,以所述耐冷性水稻品系为对照,利用耐冷基因连锁标记对回交一代群体表型与水稻恢复系相似的单株进行分子标记比对检测,筛选出含有耐冷基因连锁标记的株系,将所述株系与水稻恢复系回交,再自交,对每个世代的株系逐级比对筛选,获得含有耐冷基因的水稻品系。
- [0018] 在本发明的一些实施例中,步骤(4)中,分别提取所述耐冷性水稻品系和回交株系的基因组总DNA,分别以与耐冷基因POG-2、qPOG-3和qPOG-7紧密连锁的分子标记RM250、RM5958、RM218、RM232、RM418和RM7110为引物,进行PCR扩增,对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,以所述耐冷性水稻品系为对照,对每个世代的株系逐级比对筛选,筛选出与对照分子标记一致的株系。
- [0019] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM418序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物RM418序列如SEQ ID NO.2所示。
- [0020] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM7110序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物RM7110序列如SEQ ID NO.4所示。
- [0021] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM218序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物RM218序列如SEQ ID NO.6所示。
- [0022] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM232序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物RM232序列如SEQ ID NO.8所示。
- [0023] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM5958序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物RM5958序列如SEQ ID NO.10所示。
- [0024] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM250序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物RM250序列如SEQ ID NO.12所示。
- [0025] 在本发明的一些实施例中,PCR反应体系为25 μ L,包括10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10mM dNTP 0.5 μ L、5U/ μ L Taq酶0.25 μ L、引物2.0 μ L、DNA模板2.0 μ L、ddH₂O 17.75 μ L。
- [0026] 在本发明的一些实施例中,PCR的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,共35个循环,然后25 $^{\circ}$ C 10min。
- [0027] 在本发明的一些实施例中,步骤(4)中,通过芽期耐冷性鉴定和幼苗期耐冷性鉴

定,筛选获得耐冷水稻品系。

[0028] 本发明第二方面提供由上述方法制得的耐冷水稻。

[0029] 本发明第三方面提供一种杂交水稻,由上述耐冷水稻品系与水稻不育系杂交获得。

[0030] 在本发明的一些实施例中,所述水稻不育系宜香A、中9A、金23A、II-32A、冈46A、珍汕97A中的至少一种。

[0031] 本发明第四方面提供上述方法制得的耐冷水稻品系或杂交水稻品系。

[0032] 本发明第五方面提供一种耐冷水稻的分子标记检测方法,包括如下步骤:

[0033] a) 分别提取耐冷性水稻和待测水稻的基因组总DNA;

[0034] b) 分别以与耐冷基因POG-2、qPOG-3和qPOG-7紧密连锁的分子标记RM250、RM5958、RM218、RM232、RM418和RM7110为引物,进行PCR扩增,对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,以所述耐冷性水稻为对照,若待测水稻与对照分子标记一致,表明耐冷基因的存在。

[0035] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM418序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物RM418序列如SEQ ID NO.2所示。

[0036] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM7110序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物RM7110序列如SEQ ID NO.4所示。

[0037] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM218序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物RM218序列如SEQ ID NO.6所示。

[0038] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM232序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物RM232序列如SEQ ID NO.8所示。

[0039] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM5958序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物RM5958序列如SEQ ID NO.10所示。

[0040] 在本发明的一些实施例中,正向引物RM250序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物RM250序列如SEQ ID NO.12所示。

[0041] 在本发明的一些实施例中,PCR反应体系为25 μ L,包括10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10mM dNTP 0.5 μ L、5U/ μ L Taq酶0.25 μ L、引物2.0 μ L、DNA模板2.0 μ L、ddH₂O 17.75 μ L。

[0042] 在本发明的一些实施例中,PCR的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,共35个循环,然后25 $^{\circ}$ C 10min。

[0043] 如上所述,本发明的一种耐冷水稻的分子育种方法,具有以下有益效果:本发明采用恢复系水稻与耐冷性水稻杂交,实现对农艺性状优良而耐冷性差的亲本材料的改良,将耐冷基因高效地转移至回交后代中,从而创制出耐冷水稻新材料。

附图说明

[0044] 图1显示为RM418在BC₁的分子检测结果

[0045] 图2显示为RM7110在BC₂的分子检测结果。

[0046] 图3显示为RM218在BC₃的分子检测结果。

[0047] 图4显示为RM5958在BC₄的分子检测结果。

[0048] 图5显示为RM232在BC₄F₁的分子检测结果。

[0049] 图6显示为RM250在BC₄F₂的分子检测结果。

具体实施方式

[0050] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0051] 须知,下列实施例中未具体注明的工艺设备或装置均采用本领域内的常规设备或装置;所有压力值和范围都是指绝对压力。

[0052] 此外应理解,本发明中提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还可以存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤,除非另有说明;还应理解,本发明中提到的一个或多个设备/装置之间的组合连接关系并不排斥在所述组合设备/装置前后还可以存在其他设备/装置或在这些明确提到的两个设备/装置之间还可以插入其他设备/装置,除非另有说明。而且,除非另有说明,各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具,而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容的情况下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0053] 下述实施例设置三次重复实验,结果取平均值,实验方法,无特殊说明,均为常规方法,如分子标记筛选所用的PCR反应体系和扩增程序,分子试验所用的试验材料,均为常规生化试剂,可到生化试剂代理商或试剂店购买。所用亲本材料蜀恢527和糯稻89-1可从中国农业科学院作物科学研究所品种资源库购买。配组杂交组所用的宜香A、中9A、金23A、II-32A、冈46A、珍汕97A 6个不育系均为广泛应用的普通材料,可从农业科研单位、高等院校及种子企业购买,在中国国家水稻数据中心也可查找。

[0054] 需要说明的是,亲本不限于蜀恢527和糯稻89-1,也可采用其他亲本恢复系与耐冷系杂交,杂交F₁种子与水稻恢复系回交的代数可以为4-6代,具体根据水稻恢复系的性状转移至耐冷水稻品系的程度而定,本实施例以回交4代为例进行实验,根据实验,回交4代后,水稻恢复系的性状被充分转移至耐冷水稻品系。回交后,耐冷水稻品系的自交代数可以为2-4代,具体自交代数根据品系性状的稳定程度而定,自交至品系性状稳定即可,本实施例以自交2代为例进行实验。

[0055] 详细技术说明如下:

[0056] 一、亲本材料。水稻耐冷材料糯稻89-1:中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源库,统一编号ZD06709。糯稻89-1能通过腋芽抗御低温休眠越冬,多年萌发再生,越冬稻苗生长整齐,产量与正季相当,可达6.29t/hm²,芽期和幼苗期的耐冷性均达到1级耐冷标准,携有qPOG-2, qPOG-3和qPOG-7三个耐冷基因。水稻恢复系蜀恢527:中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源库,统一编号32-00115。蜀恢527用1318与88-R3360杂交育成,1318系四川农业大学用强恢复系材料圭630、古154和抗稻瘟病的IR1544-28-2-3聚合杂交育成的抗稻瘟病的重穗型恢复材料;88-R3360系米质较优的辐36-2与IR24杂交育成的优质强恢复力材料。

[0057] 二、逐级分子筛选技术。提取糯稻89-1及蜀恢527与糯稻89-1杂交后的回交世代(BC₁、BC₂、BC₃、BC₄、BC₄F₁、BC₄F₂)株系的基因组总DNA,分别以与越冬耐冷基因POG-2, qPOG-3

和qPOG-7紧密连锁的分子标记RM250、RM5958、RM218、RM232、RM418和RM7110为引物,进行PCR扩增,以糯稻89-1为对照,每个回交世代的株系逐级比对筛选,选择出与对照分子标记一致的株系。扩增反应混合液体积为25 μ L,其中10 \times PCR buffer 2.5 μ L,10mM dNTP 0.5 μ L,5U/ μ L Taq酶0.25 μ L,引物2.0 μ L,DNA模板2.0 μ L,ddH₂O 17.75 μ L。PCR的反应参数为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,共35个循环,然后25 $^{\circ}$ C 10min。PCR扩增完毕后,反应产物进行3%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统扫描记录电泳结果。关于耐冷基因POG-2,qPOG-3和qPOG-7的报道,详见:Identification of Quantitative Trait Locus for Overwintering Germinability in Rice (*Oryza sativa* L.),ZHAO Zheng-wu,LUO An-cai₁,LE Tao and LI Shi-gui.Journal of Integrative Agriculture.2012,11(11):1767-1774.

[0058] 具体的筛选方法如下:

[0059] 1、回交群体耐冷材料逐级分子筛选

[0060] (1) 以农艺性状优良的恢复系蜀恢527为母本,以耐冷性强的糯稻89-1为父本杂交,获得杂交F₁种子200粒。

[0061] (2) 以恢复系蜀恢527为轮回亲本与杂交F₁回交,获得回交一代群体(BC₁)种子12000粒。

[0062] (3) 将BC₁按20 \times 30cm规格种植,每行种植12窝,每窝种植1粒谷秧,共种植10000窝,走道50cm。

[0063] (4) 在稻苗分蘖期,以耐冷亲本糯稻89-1为对照,利用耐冷基因连锁标记6个(见表1)对回交一代群体表型与蜀恢527相似的单株进行分子标记比对检测,筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株100株,与蜀恢527回交获得回交二代群体(BC₂)种子6000粒。

[0064] 表1本发明耐冷基因连锁标记引物序列组成如下表所示:

[0065]

编号	引物	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	染色体
1	RM418	CGATCGAGCATCAACACAACG (SEQ ID NO.1)	GACGTATCGCGTATCGTCATGC (SEQ ID NO.2)	7
2	RM7110	ACGGCGATCTCTGTGTTTATTGC (SEQ ID NO.3)	CTATTAACCGGTTGAGATGGTGA GC (SEQ ID NO.4)	7
3	RM218	TCAAACCAAGGTCCTTCAACTG C (SEQ ID NO.5)	TTTCTTCCACCGTCCATGTATCC (SEQ ID NO.6)	3
4	RM232	CCGGTATCCTTCGATATTGC (SEQ ID NO.7)	CCGACTTTTCCTCCTGACG (SEQ ID NO.8)	3
5	RM5958	ACATGGACAGCTGCGTCTCG (SEQ ID NO.9)	AGGACGACGATGAGAAAGAGAG G (SEQ ID NO.10)	2
6	RM250	GTTCAAACCAAGCTGATCACA GC (SEQ ID NO.11)	GCGTCAGAGTCAGAGATGAAG G (SEQ ID NO.12)	2

[0066] (5) 按步骤(3)种植BC₂ 5000窝,按步骤(4)筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株50株,与蜀恢527回交获得回交三代群体(BC₃)种子3000粒。

[0067] (6) 按步骤(3)种植BC₃ 2000窝,按步骤(4)筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株50株,与蜀恢527回交获得回交四代群体(BC₄)种子2000粒。

[0068] (7) 按步骤(3)种植BC₄ 1500窝自交,按步骤(4)筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株50株,获得回交四代自交一代(BC₄F₁)种子1000粒。

[0069] (8) 按步骤(3)种植BC₄F₁ 500窝自交,按步骤(4)筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株10株,收取回交四代自交二代(BC₄F₂)种子1000粒。

[0070] 2、耐冷材料的表型筛选鉴定

[0071] 通过分子筛选技术逐级选择至回交四代自交二代(BC₄F₂)的耐冷材料,进行芽期和苗期耐冷性鉴定,通过分子标记和表型鉴定双重筛选,创制耐冷材料。

[0072] 具体步骤如下:

[0073] (1) 芽期耐冷性鉴定。试验前将步骤1(8)所得的回交四代自交二代(BC₄F₂)种子置入烘箱45℃烘48小时,使其充分干燥,将100粒饱满种子放入盛水的100mL烧杯,浸种1天,用自来水洗涤3-4次,倾去水,将种子均匀置入培养皿中,用软纸覆盖,在30℃催芽2-3天,催芽后再用自来水洗涤1-2次,加水少许,将培养皿置于5℃的冰箱内处理10天,从冰箱取出置于室外,温度低于30℃,恢复生长10天后进行耐寒性评级,评级标准见表2。

[0074] 表2水稻芽期和苗期耐冷性分级标准

级别	分级标准	
	芽期耐冷性	幼苗期耐冷性
1	所有的幼芽全部诱发成绿苗,叶色青绿	所有叶青绿或接近青绿
3	死苗率在 1%-30%	叶子有一点脱色或黄色
5	死苗率在 30%-50%之间	叶子大部分黄化
7	死苗率在 50%以上	50%叶子干枯,有些苗死亡
9	苗全部死亡	大部分或全部苗死亡

[0075] [0076] (2) 幼苗期耐冷性鉴定。取步骤1(8)所得的回交四代自交二代(BC₄F₂)种子,在常温下生长至3-4叶龄,取50个单株秧苗放置在5-12℃低温下处理7天。根据幼苗的赤枯程度进行评级(0-9),评级标准见表2。

[0077] 3、杂交组合的耐冷性鉴定。利用步骤1和2筛选鉴定出的耐冷材料以及蜀恢527与多个不育系测配,配制杂交组合,按步骤2中的小步骤(1)和(2)的方法对杂交组合进行耐冷性鉴定。

[0078] 具体地,用BC₄F₂与宜香A、中9A、金23A、Ⅱ-32A、冈46A、珍汕97A配组杂交组合,并进行芽期和苗期耐冷性鉴定,BC₄F₂与6个不育系配制的杂交组合芽期和苗期的耐冷性均高于蜀恢527所配组合,耐冷性高1-2个等级,其中,中9A/BC₄F₂、金23A/BC₄F₂、冈46A/BC₄F₂、珍汕97A/BC₄F₂四个组合耐冷性最强,芽期和苗期均为三级。

[0079] 本实施例选用农艺性状优良的恢复系蜀恢527为母本,以携有越冬耐冷基因的糯稻89-1为父本杂交获得杂交F₁种子,以恢复系蜀恢527为轮回亲本与杂交F₁回交,获得回交一代群体(BC₁)种子12000粒,种植BC₁群体10000株,以耐冷亲本糯稻89-1为对照,利用耐冷基因连锁标记RM418、RM7110、RM218、RM232、RM5958、RM250对回交一代群体表型与蜀恢527

相似的单株进行分子标记比对检测(以后每个回交和自交世代均进行比对检测),筛选出含有耐冷基因连锁标记的单株100株,逐级回交至回交四代群体(BC₄),再自交二代,收取回交四代自交二代(BC₄F₂)种子1000粒,分别用300粒BC₄F₂种子及亲本鉴定芽期和苗期耐冷性,每个处理100粒,三次重复,鉴定结果表明BC₄F₂芽期和苗期耐冷性分别为3级和1级,糯稻89-1芽期和苗期耐冷性均为1级,蜀恢527芽期和苗期耐冷性分别为9和7级。用BC₄F₂与宜香A、中9A、金23A、II-32A、冈46A、珍汕97A配组杂交组合,并进行耐冷性鉴定,结果见表3。

[0080] 表3 BC₄F₂和蜀恢527杂交后代芽期和苗期耐冷性鉴定结果

[0081]

耐冷材料	不育系 级 别	宜香 A	中 9A	金 23A	II-32A	冈 46A	珍汕 97A
		芽期	5	3	3	5	3
BC ₄ F ₂	苗期	3	3	3	3	3	3
	产量 (t/hm ²)	8.86	8.45	8.53	8.12	9.06	8.63
	芽期	9	7	7	9	7	7
蜀恢 527	苗期	9	7	5	9	7	5
	产量 (t/hm ²)	9.22	8.32	8.58	8.64	8.69	8.37

[0082] 从表3可以看出,BC₄F₂与不育系杂交后,获得的水稻品系的耐冷级别明显高于蜀恢527与不育系杂交后获得的水稻品系的耐冷级别,而产量上并没有明显下降,说明本发明在显著提高耐冷性的同时,还保证了水稻良好的产量。

[0083] 本实施例对回交群体和自交群体耐冷材料逐级分子筛选,通过对耐冷材料及其杂交后代耐冷性的表型筛选鉴定,实现对农艺性状优良而耐冷性差的亲本材料的改良;通过分子标记和表型鉴定双重筛选,选择效果准确可靠。

[0084] 图1-图6所示为RM标记在回交及自交后代检测结果中的代表性图谱,如图1所示为RM418在BC₁的分子检测结果(编号1为耐冷亲本糯稻89-1的电泳条带,其它编号为BC₁株系的电泳条带),如图2所示为RM7110在BC₂的分子检测结果,如图3所示为RM218在BC₃的分子检测结果,如图4所示为RM5958在BC₄的分子检测结果,如图5所示为RM232在BC₄F₁的分子检测结果,如图6所示为RM250在BC₄F₂的分子检测结果。各世代耐冷株系筛选时,涉及的条带较多,图1-图6所示仅为其中一部分代表性条带。

[0085] 本实施例中,所述的逐级分子筛选是指以农艺性状优良的恢复系蜀恢527为母本,以耐冷性强的糯稻89-1为父本杂交,获得杂交F₁种子后,以恢复系蜀恢527为轮回亲本与杂交F₁回交,从回交一代群体(BC₁)开始,回交至四代群体(BC₄),然后再自交两代(BC₄F₂),在逐级回交群体中,通过群体单株与耐冷性强的糯稻89-1分子标记的比对,筛选出耐冷材料,同时,通过群体单株与蜀恢527在田间优良农艺性状的比对选择来取舍耐冷材料。利用优异水稻耐冷资源,挖掘新基因,采用回交群体耐冷材料逐级分子筛选,并且,还可以对耐冷材料及其杂交后代耐冷性的表型进行鉴定,实现耐冷基因高效转移,从而创制出耐冷水稻新材料。

[0086] 综上所述,本实施例以农艺性状优良的恢复系蜀恢527为母本,以耐冷性强的糯稻

89-1为父本杂交,获得杂交F₁种子后,以恢复系蜀恢527为轮回亲本与杂交F₁回交,从回交一代群体(BC₁)开始,回交至四代群体(BC₄),然后再自交两代(BC₄F₂),在逐级回交群体中,通过群体单株与耐冷性强的糯稻89-1分子标记的比对,筛选出耐冷材料;耐冷材料的表型筛选鉴定:对分子选择鉴定结果较好的材料进行芽期和苗期耐冷性鉴定,通过分子标记和表型鉴定双重筛选,创制耐冷材料;杂交组合的耐冷性鉴定;利用筛选鉴定出的耐冷材料以及蜀恢527与多个不育系测配,配制杂交组合,并鉴定其耐冷性,比对创制材料的耐冷效果。

[0087] 本发明的有益效果如下:本发明采用恢复系水稻与耐冷性水稻杂交,实现对农艺性状优良而耐冷性差的亲本材料的改良,将耐冷基因高效地转移至回交后代中,从而创制出耐冷水稻新材料。

[0088] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

SEQUENCE LISTING

<110> 重庆师范大学

<120> 一种耐冷水稻的分子育种方法

<130> PCQSF172863

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 正向引物RM418

<400> 1

cgatcgagca tcaacacaac g 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物RM418

<400> 2

gacgtatcgc gtatcgtcat gc 22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 正向引物RM7110

<400> 3

acggcgatct ctgtgtttat tgc 23

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物RM7110

<400> 4

ctattaaccg gttgagatgg tgagc 25

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 正向引物RM218
<400> 5
tcaaaccaag gtccttcaac tgc 23
<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 反向引物RM218
<400> 6
tttcttccac cgtccatgta tcc 23
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 正向引物RM232
<400> 7
ccggtatcct tcgatattgc 20
<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 反向引物RM232
<400> 8
ccgacttttc ctctgacg 19
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 正向引物RM5958
<400> 9

acatggacag ctgcgtctcg 20
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 反向引物RM5958
<400> 10
aggacgacga tgagaaagag agg 23
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 正向引物RM250
<400> 11
gttcaaacca agctgatcac aagc 24
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 反向引物RM250
<400> 12
ggcgtcagag tcagagatga agg 23



图1



图2



图3



图4



图5



图6