



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107155873 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710581589.2

(22)申请日 2017.07.17

(71)申请人 安徽省农业科学院水稻研究所

地址 230031 安徽省合肥市农科南路40号

(72)发明人 宋丰顺 杨剑波 倪大虎 倪金龙

李莉 罗志祥 夏家发 张德文

周坤能 张丛合

(74)专利代理机构 北京律谱知识产权代理事务

所(普通合伙) 11457

代理人 黄云铎

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

A01G 16/00(2006.01)

A01G 13/00(2006.01)

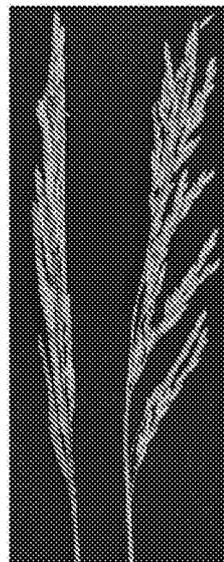
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种使杂交稻父本不结实的制种方法

(57)摘要

本发明公开了一种使杂交稻父本不结实的制种方法。所述方法包括:(1)、制备或获取水稻抗性基因ALS或者含有所述水稻抗性基因ALS的水稻品种;(2)、利用所述水稻抗性基因ALS培育出抗咪唑啉酮类除草剂的水稻不育系;(3)、用抗性不育系与对咪唑啉酮类除草剂敏感的恢复系配置新的杂交组合;(4)、对所配置的新的杂交组合进行混播制种;(5)、在父本花期,喷施咪唑啉酮类除草剂,使父本不结实,而母本正常结实;(6)收获水稻种子。本发明利用的是突变体抗性材料而非转基因材料,回避了转基因带来的安全性问题;除草剂在开花后喷施,可以避免除草剂对花粉活力和920使用效果的负面影响。



1. 一种使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述方法包括下述步骤:
 - (1)、制备或获取水稻抗性基因ALS或者含有所述水稻抗性基因ALS的水稻品种;
 - (2)、利用所述水稻抗性基因ALS培育出抗咪唑啉酮类除草剂的水稻抗性不育系;
 - (3)、用所培育的水稻抗性不育系与对咪唑啉酮类除草剂敏感的恢复系配置新的杂交组合;
 - (4)、对所配置的新的杂交组合进行混播制种;
 - (5)、在预定时间点喷施咪唑啉酮类除草剂,使父本不结实,而母本正常结实;
 - (6)收获水稻种子。
2. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述步骤(2)包括将含有ALS基因的水稻与水稻不育系杂交或回交。
3. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述步骤(2)包括:
 - 步骤(2-1)将含抗性基因ALS的水稻与水稻不育系杂交,获得杂交种子F1;
 - 步骤(2-2)种植杂交种子F1,收获种子F2;
 - 步骤(2-3)对种子F2利用预定除草剂进行浸泡;
 - 步骤(2-4)将浸泡后的种子催芽成苗;
 - 步骤(2-5)将所培育的水稻苗植入大田进行种植,获得水稻植株;
 - 步骤(2-6)从所述水稻植株中选取预定数目的植株,获取相应种子并进行加代种植,在苗期喷施预定除草剂;
 - 步骤(2-7)在花期结束继续喷施预定除草剂;
 - 步骤(2-8)获得相应抗性不育系种子。
4. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述步骤(2)包括:
 - 步骤(2.1)将含抗性基因ALS的水稻与水稻不育系杂交,获得杂交种子F1;
 - 步骤(2.2)种植杂交种子F1,用水稻不育系回交获得BC1F1;
 - 步骤(2.3)对BC1F1世代各单株用分子标记辅助选择含有ALS基因的杂合单株,继续用水稻不育系回交,获得BC2F1;
 - 步骤(2.4)重复步骤(3-3),直至回交到需要的世代BCnF1;
 - 步骤(2.5)播种BCnF1,收获种子,获得BCnF2;
 - 步骤(2.6)利用分子标记辅助选择含有纯合的ALS基因单株,在苗期喷施预定除草剂;
 - 步骤(2.7)在花期结束继续喷施预定除草剂;
 - 步骤(2.8)获得相应抗性不育系种子。
5. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述步骤(5)包括在父本花期基本结束时,喷施咪唑啉酮类除草剂。
6. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述含有所述水稻抗性基因ALS的水稻品种为D3-10。
7. 根据权利要求1所述的使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述水稻不育系的品种为水稻1892s。

一种使杂交稻父本不结实的制种方法

技术领域

[0001] 本发明涉及杂交水稻制种领域,具体涉及一种水稻抗除草剂基因在水稻混播制种领域的应用,其中利用了人工诱变获得的抗咪唑啉酮类除草剂基因ALS。

背景技术

[0002] 杂交水稻为我国乃至全球粮食安全做出了巨大贡献,我国水稻面积约一半为杂交水稻。上世纪八十年代建立的杂交水稻制种技术30多年来保障了我国杂交水稻发展的供种需求。但是这项技术属于劳动力密集型技术,从栽秧到收获都需要大量的人工操作。随着我国经济的发展和城镇化加速,农村劳动力日益短缺,已严重影响到杂交水稻种子生产安全。且劳动力成本越来越高,也导致杂交稻制种成本的不断攀升。所以,劳动力密集型的制种技术已经不能满足杂交稻发展的需求。以机械代替人工,大幅减少劳力投入和降低劳动强度,实现杂交水稻制种的全程机械化成为当前生产的迫切需要。

[0003] 目前,机械化制种主要有两种模式。一种是以美国南部水稻产区为代表的父母本宽行种植模式,该模式是在我国80年代建立的制种技术基础上发展起来的,其父母本仍相间栽植,但是父母本的行数均较中国的传统模式增加很多,如父本20行,母本80行,较宽的行数适合机械栽插和收获种子。这种模式要求制种田块大,土地平整度高,在很多地方不适合我国的国情,因为我国的水稻田,多位于丘陵和山区的低洼地,大面积成片的水稻田少,很难满足这种机械作业模式。且传粉距离远,可能影响制种产量。

[0004] 另一种是混播模式。1991年,日本学者Kiyooki Maruyamar提出了混播制种(Mixed planting)的设想。混播制种是指将父母本种子按一定的比例均匀混合后播种和栽插,成熟时机械化收割,通过各种方法(包括苯达松敏感法、粒型法、色选法等)分离出杂交种和父本F₁。混播制种打破了常规的父母本分行栽植的限制,让父本和母本按一定比例充分混合,栽插在一起,以减小传粉距离,增加结实率。另外,混播模式对田块的要求小,在许多地方更符合中国国情。由于条件限制,Kiyooki Maruyamar未能真正在田间实现混播制种的设想。2000年,朱启升等将苯达松敏感致死基因杂交导入籼型杂交稻父本,并选育出父母本生育期一致的杂交组合,混播制种,始穗期喷施除草剂苯达松,授粉之后父本死亡,母本正常结实,成熟时机械收获,获得杂交种F₁。经多年试验,我们发现这种方法存在以下问题:1)父本死亡时间较长,在花期喷施苯达松,从喷药到父本死亡需要20多天,一般会在开花前就喷施苯达松,即使这样,仍然有部分父本结实,影响了杂交种的纯度;2)为使父本死亡彻底,需要喷施高剂量的苯达松,这往往会影响到母本的结实率,导致制种产量不高;3)开花前喷施苯达松可能会带来副作用,如花粉活力、对920的敏感性等;4)当前市面销售的很多水稻除草剂含有苯达松或类似物(如直播宝),使得制种过程中秧田和苗期管理除草剂的使用特别需要注意,错施含有苯达松类似物的除草剂将会使父本提前死亡,导致制种失败。

[0005] 2001年,傅亚萍等将除草剂抗性基因通过转基因方法导入不育系培矮64s。但是由于转基因材料存在潜在的食用或环境安全性风险,安全性评价需要多年才能完成,所以这种方法也一直没有在生产上应用。

[0006] 因此,目前通过除草剂分选杂交种和父本的混播制种方法都有一定的局限性,在应用上都存在潜在风险。朱启升等所提出的方法一旦苗期错施含有苯达松类似物的除草剂将会使父本提前死亡,导致制种失败。傅亚萍等提出的方法则带来了转基因方面的隐患。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题在于提供了一种能够适应我国的水稻种植环境、操作简单、适于推广应用、制种纯度高的制种方法。

[0008] 本发明的方法主要利用一种水稻抗性基因ALS。2012年,陈竹锋等通过EMS诱变的方法(专利:水稻抗除草剂蛋白及其在植物育种中的应用,申请号:201210037789.9)筛选获得抗咪唑啉酮类除草剂的显性突变体并证明突变体D3-10是由于als的第548位氨基酸Trp突变为Met所导致。但是,目前,人们主要利用ALS基因为水稻提供除草剂抗性,进而增强水稻对除草剂的耐受性。

[0009] 本发明人正是尝试了各种除草剂及其敏感和抗性材料在混播制种中的研究实践,偶然地发现ALS突变体及咪唑啉酮类除草剂可有效抑制混播制种中父本的结实,本发明既回避了转基因的安全性评估,又避开苯达松敏感致死基因在混播制种中带来的负面效应。而且,申请人发现,咪唑啉酮类除草剂在使用时,只需要在花期结束之前进行喷施,就能够确保父本不结实,而且不需要过大的用量。

[0010] 具体而言,本发明提供一种使杂交稻父本不结实的制种方法,其特征在于,所述方法包括下述步骤:

[0011] (1)、制备或获取水稻抗性基因ALS或者含有所述水稻抗性基因ALS的水稻品种;

[0012] (2)、利用所述水稻抗性基因ALS培育出抗咪唑啉酮类除草剂的水稻抗性不育系;

[0013] (3)、用所培育的水稻抗性不育系与对咪唑啉酮类除草剂敏感的恢复系配置新的杂交组合;

[0014] (4)、对所配置的新的杂交组合进行混播制种;

[0015] (5)、在预定时间点喷施咪唑啉酮类除草剂,使父本不结实,而母本正常结实;

[0016] (6)收获水稻种子。

[0017] 优选地,所述步骤(2)包括将含有ALS基因的水稻与水稻不育系杂交或回交。

[0018] 优选地,所述步骤(2)包括:

[0019] 步骤(2-1)将含抗性基因ALS的水稻与水稻不育系杂交,获得杂交种子F1;

[0020] 步骤(2-2)种植杂交种子F1,收获种子F2;

[0021] 步骤(2-3)对种子F2利用预定除草剂进行浸泡;

[0022] 步骤(2-4)将浸泡后的种子催芽成苗;

[0023] 步骤(2-5)将所培育的水稻苗植入大田进行种植,获得水稻植株;

[0024] 步骤(2-6)从所述水稻植株中选取预定数目的植株,获取相应种子并进行加代种植,在苗期喷施预定除草剂;

[0025] 步骤(2-7)在花期结束继续喷施预定除草剂;

[0026] 步骤(2-8)获得相应抗性不育系种子。

[0027] 优选地,所述步骤(2)包括:

[0028] 步骤(2.1)将含抗性基因ALS的水稻与水稻不育系杂交,获得杂交种子F1;

- [0029] 步骤(2.2)种植杂交种子F1,用水稻不育系回交获得BC1F1;
- [0030] 步骤(2.3)对BC1F1世代各单株用分子标记辅助选择含有ALS基因的杂合单株,继续用水稻不育系回交,获得BC2F1;
- [0031] 步骤(2.4)重复步骤(3-3),直至回交到需要的世代BCnF1;
- [0032] 步骤(2.5)播种BCnF1,收获种子,获得BCnF2;
- [0033] 步骤(2.6)利用分子标记辅助选择含有纯合的ALS基因单株,在苗期喷施预定除草剂;
- [0034] 步骤(2.7)在花期结束继续喷施预定除草剂;
- [0035] 步骤(2.8)获得相应抗性不育系种子。
- [0036] 优选地,所述步骤(5)包括在父本花期基本结束时,喷施咪唑啉酮类除草剂。
- [0037] 优选地,所述含有所述水稻抗性基因ALS的水稻品种为D3-10。
- [0038] 优选地,所述水稻不育系的品种为水稻1892s。
- [0039] 综上所述,本发明首先利用ALS基因培育抗咪唑啉酮类除草剂的不育系。将含有ALS基因的水稻与水稻不育系杂交或回交,在分离后代中选择含有抗咪唑啉酮类除草剂、且农艺性状优良的雄性不育株,繁殖不育单株,不断选择和纯合,以培育出新的抗咪唑啉酮类除草剂不育系。

[0040] 其次,用新培育的抗性不育系与恢复系(含als基因,对咪唑啉酮类除草剂敏感)广泛测配,评价农艺性状,筛选出符合生产要求的杂交稻新组合。

[0041] 随后,对新选育的杂交稻组合进行混播制种。如果组合的父母本生育期基本一致,可以将父母本按照一定比例混合,同期播种,栽插。如果父母本生育期不一致,可参照专利:一种集合抛秧和直播技术实现杂交水稻机械化制种的生产方法(申请号:201310497322.7)的方法,采用抛秧结合直播的方法,实现混播制种。在父本花期基本结束时,喷施咪唑啉酮类除草剂,优选灭草烟,使父本种子不结实,而母本正常结实,种子成熟时,机械化收割种子,即获得杂交种子,从而实现杂交稻制种的机械化。

[0042] 有益效果:

[0043] 与现有的混播制种方法相比,本发明的混播制种方法的优点主要体现在以下几个方面:1)利用的是突变体抗性材料而非转基因材料,回避了转基因带来的安全性问题;2)混播制种过程中,除草剂在开花后喷施,可以避免除草剂对花粉活力和920使用效果的负面影响;3)可使父本完全不结实,而母本的结实不受影响;4)由于水稻对咪唑啉酮类除草剂天然敏感,所以市面销售的水稻专用除草剂不含水稻敏感的咪唑啉酮类除草剂成分,避免了误施咪唑啉酮类除草剂的可能性,使得制种田草害管理可以放心使用水稻专用除草剂来防治杂草。

附图说明

[0044] 图1显示了花期喷施“百垄通”30天后D3-10和黄华占的植株情况左侧为黄华占,穗部不弯头,右侧为D3-10,结实正常。

[0045] 图2显示了花期喷施“百垄通”30天后D3-10和黄华占的穗部情况左侧为黄化占,全部为空瘪谷,右侧为D3-10,结实饱满。

具体实施方式

[0046] 下面具体描述本发明的若干实施例,需要说明的是下述实施例仅作为实例而非对本发明的限制。

[0047] 实施例1:

[0048] 以下叙述本发明的实施例。应该说明,本发明的实施例只对本发明起说明作用,而没有任何限制作用。本领域技术人员可以对本发明作出某些等同的改动和显而易见的改进。

[0049] 一、花后喷施咪唑啉酮类除草剂对D3-10和黄华占结实的影响

[0050] D3-10为黄华占的ALS突变体,抗咪唑啉酮类除草剂(参见专利:抗除草剂基因OsmALS的HRM检测方法和应用,申请号:201410814731.X)。将D3-10和黄华占同期播种,栽植,约70%的颖花开花结束后喷施2%“百垄通”(巴斯夫公司生产,有效成分:240g/L甲咪唑啉烟酸,属于咪唑啉酮类除草剂),以不喷施除草剂作为对照,30天后,随机抽取5穗调查平均结实率,结果见表1。由表1知,D3-10在喷施百垄通和不喷施百垄通情况下,结实率无明显差异;而黄华占在喷施“百垄通”和不喷施“百垄通”两种情况下,结实有巨大差异,不喷施除草剂结实率为89.7%,而喷施除草剂后,结实率为0,虽然发现少数饱满的种子,但是用手挤压这些种子,种皮内全部为水溶液。说明含als基因的材料,在花后喷施“百垄通”可彻底抑制结实,而含有ALS基因抗咪唑啉酮类除草剂的材料,结实却不受影响,尽管敏感材料和抗性材料的植株都没有死亡(图1和图2)。

[0051] 表1:D3-10和黄化占花后喷施“百垄通”结实变换情况

[0052]

株系号	喷除草剂	未喷除草剂
D3-10	95.6%	94.9%
黄华占	0%	89.7%

[0053] 二、利用ALS基因培育抗咪唑啉酮类除草剂的不育系

[0054] 用D3-10与水稻不育系1892s杂交,种植杂交F1,收获种子(F2),经2%“百垄通”(巴斯夫公司生产,有效成分:240g/L甲咪唑啉烟酸)”浸泡24小时后,用水冲洗5次,每次5分钟,然后于35℃恒温培养箱中催芽发苗,将能够发芽成苗的单株移栽入大田,种植株数约3500株,调节播种期,使分离群体的花期分布在8月份(合肥8月份的气温>26℃),花期观察单株育性,并结合农艺性状选择优良的不育单株共38株。对这38个单株割茬秋繁不育系种子,带海南加代,并在苗期喷施2%“百垄通”,有9个株系无抗性分离,所有单株均表现为抗性。对这9个株系,每个株系取3株,栽植于桶内,以1892s为对照,花期结束喷施2%“百垄通”,共500ml。30天后,统计结实率,如表2。由表2知抗性株系喷除草剂和不喷施除草剂,结实率变化不明显,但是对照1892s喷除草剂的结实率为0%,不喷施时结实率为74.3%,差异明显。

[0055] 表2各株系除草剂使用和未使用结实结实率对比

[0056]

株系号	喷除草剂	未喷除草剂
		剂

[0057]	R3	54.7%	57.2%
	R9	43.6%	40.9%
	R13	71.4%	67.3%
	R19	34.6%	38.5%
	R20	56.1%	53.7%
	R22	74.0%	70.8%
	R23	63.5%	69.7%
	R27	55.9%	52.3%
	R34	50.4%	55.7%
	1892s (ck)	0%	74.3%

[0058] 收获9份抗性不育系的种子,继续加代繁殖,单株选择,在F5带获得基本稳定的不育性。

[0059] 另外,发明人以D3-10为供体,1892s为受体,连续回交,在回交世代,通过分子标记辅助选择的方法(专利:抗除草剂基因OsmALS的HRM检测方法和应用,申请号:201410814731.X)选择含有ALS基因的单株,继续回交,目前已经获得高代回交材料。

[0060] 三、配合力的测定和组合的筛选

[0061] 以稳定的抗性不育系为母本,与一批优良的恢复系(如RH003、9311、粤禾丝苗、五山丝苗等)共计43个进行测配,种植F1,并评价杂种优势。发现抗性不育系R19配置RH003和五山丝苗,杂种优势较强,R19的播始历期比RH003短2天,比五山丝苗短约10天。

[0062] 四、混播制种

[0063] 将R19和RH003按照1:5的比例混合种子,常规浸种和催芽,播种于秧田,秧龄30天时,移栽入大田,正常管理,抽穗约10%时,割叶,喷施920。绳索赶粉。父本尾花时,喷施2%“百垄通”,母本种子成熟后,机械收割。

[0064] 对于组合R19/五山丝苗,将五山丝苗抛秧盘育秧,秧龄10天后,抛秧入大田,同时母本催芽,直播入大田。其他管理同上,父本尾花时,喷施2%“百垄通”,母本种子成熟后,机械收割。

[0065] 另外,在播种和苗期小面积试用了从市场购买的“直播宝”、“野老”、“氟氰草酯”和“苯并黄酮”,按照说明书使用,未发现有药害。

[0066] 五、纯度的检测

[0067] 混收的杂交稻种子带到海南冬季进行纯度鉴定,种植500株,结果组合R19/RH003的纯度为98.6%,R19/五山丝苗的纯度为97.4%,两个组合的纯度均符合大于96%的要求。

[0068] 从上面的制种实验可以确定,本发明的制种方法能够有效地以高于96%的纯度进行杂交水稻的制种。制种过程中,可以使父本完全不结实,而母本的结实不受任何影响。

[0069] 虽然上面结合本发明的优选实施例对本发明的原理进行了详细的描述,本领域技

术人员应该理解,上述实施例仅仅是对本发明的示意性实现方式的解释,并非对本发明包含范围的限定。实施例中的细节并不构成对本发明范围的限制,在不背离本发明的精神和范围的情况下,任何基于本发明技术方案的等效变换、简单替换等显而易见的改变,均落在本发明保护范围之内。



图1

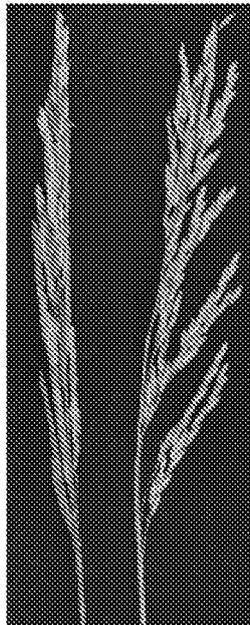


图2