

抗咪唑啉酮类除草剂水稻种质的筛选鉴定

毕俊国, 谭金松, 刘毅, 张安宁, 王飞名, 刘国兰, 余新桥, 罗利军

(上海市农业生物基因中心, 上海 201106)

摘要:咪唑啉酮类除草剂是一类广谱高效除草剂,其作用靶标是乙酰乳酸合成酶(ALS, acetolactate synthase)。培育抗咪唑啉酮类除草剂水稻品种是防治直播稻田杂草危害的有效途径之一。本研究通过喷施咪唑啉酮类除草剂,从30570份水稻种质资源中,获得1份抗咪唑啉酮类除草剂的水稻新种质,该材料抗性性状稳定、抗性效应明显,序列分析表明其ALS基因编码区第1880位的G/A突变导致第627位氨基酸由丝氨酸改变为天冬酰胺,从而产生抗性。本研究发现的抗除草剂新材料,为选育抗除草剂水稻新品种奠定了种质基础。

关键词: 水稻; 咪唑啉酮; 除草剂; 抗性

Screening and Identification of Rice Germplasm Resistant to Imidazolinone Herbicide

BI Jun-guo, TAN Jin-song, LIU Yi, ZHANG An-ning, WANG Fei-ming,

LIU Guo-lan, YU Xin-qiao, LUO Li-jun

(Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106)

Abstract: Imidazolinones, which target the acetolactate synthase, are deployed as broad spectrum and high-efficiency herbicides in order to control the weeds in agriculture. Breeding for rice varieties with resistant to imidazolinone herbicides is one of the economically effective strategies to control weeds in rice fields. In this study, a new rice germplasm resistant to imidazolinone herbicides was identified from 30570 rice germplasm accessions by spraying imidazolinone herbicides. Testing for resistance in its progeny indicated that this resistance was inheritable. Furthermore, a PCR amplification and sequencing of ALS gene encoding sequence revealed a G/A mutation at position 1880 bp position, which lead to an amino acid alteration from serine (S627) to asparagine (N627) and which might be the causal agent for herbicide resistance. Taken together, this study described an elite germplasm with a practical potential in breeding for new herbicide-resistant rice varieties.

Key words: rice; imidazolinone; herbicide; resistance

咪唑啉酮类除草剂最早是由美国氰胺公司于20世纪80年代研发并推广应用,具有广谱、高效、低毒、使用方便等优点受到市场欢迎^[1]。乙酰乳酸合成酶(ALS, acetolactate synthase)是咪唑啉酮类除草剂的靶标酶,该类除草剂作用于ALS,使之失活从而影响包括缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等支链氨基酸的合成,导致植物黄化、死亡^[2]。植物ALS

基因保守区域部分突变引起氨基酸的改变导致酶结构或空间构象发生变化,从而获得除草剂抗性。Boutsalis等^[3]研究发现在ALS基因编码的氨基酸内有5个高度保守的Domain,这5个保守区域中某个氨基酸的突变(A96、P171、A179、W548、S627)都会造成植株对除草剂产生抗性。

近年来随着农村劳动力的减少、种植结构的调

收稿日期: 2019-11-13 修回日期: 2019-12-06 网络出版日期: 2020-02-04

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191113001>

第一作者研究方向为节水抗旱稻栽培生理研究及抗除草剂资源筛选, E-mail: jgbi@sagc.org.cn

通信作者: 刘毅, 研究方向为节水抗旱稻遗传育种, E-mail: ly@sagc.org.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0300103); 上海市水稻产业技术体系(沪农科产字(2019)第3号); 国家青年自然科学基金(31501270)

Foundation project: The National Key Research and Development Program (2017YFD0300103), Shanghai Rice Industry Technology System (2019-3), National Science Foundation for Young Scientists of China (31501270)

整和种植方式的转变,直播稻的推广应用面积逐年增大。如何防治杂草是直播稻田急需解决的问题,由于杂草稻与水稻的亲缘关系较近,难以防控,其危害趋势逐年加重,是影响直播稻产量和品质的重要因素之一。喷施除草剂虽然能防治杂草,但由于杂草稻的特殊属性目前还没有针对杂草稻而不伤害水稻的除草剂。因此,除了进一步研发更有针对性的除草剂外,培育抗咪唑啉酮类除草剂水稻新品种也是一种有效途径。利用传统的诱变育种方法,比如组织培养、辐射诱变、化学诱变等均可以筛选获得抗咪唑啉酮类除草剂作物^[4],本试验通过对本单位收集保存的种质资源材料进行大规模的筛选,于2016年获得了1份抗咪唑啉酮类除草剂的水稻新种质,经2年重复鉴定均表现出稳定的抗性,为选育抗除草剂水稻新品种奠定了种质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为570份节水抗旱稻核心种质和30000份水稻导入系,收集保存于上海市农业生物基因中心基因资源数据库(<http://seed.sagc.org.cn/>);咪唑啉酮类除草剂为山东先达农化股份有限公司生产的5%咪唑乙烟酸水剂。

1.2 试验方法

1.2.1 抗咪唑啉酮类除草剂材料的筛选 试验于2016年在上海市农业科学院庄行综合试验站进行,供试材料浸种催芽后,点播于60 cm×30 cm×3.5 cm的育秧盘中,待幼苗长至3叶1心时,喷施5%咪唑乙烟酸水剂,用药量为1500 mL/hm²,均匀喷洒至叶面。2周后调查表型,无明显症状的记为抗,叶片全部黄化枯死的记为感。

1.2.2 ALS基因克隆和序列分析 采集抗咪唑啉酮类除草剂水稻单株的叶片,用常规CTAB法^[5]提取DNA,在NCBI网站搜索ALS基因的cDNA序列(登录号:AB049822),利用Primer Premier 5软件设计引物ALS F: 5'-CCAAACCCAGAAACCCCTCG-3', ALS R: 5'-GGTGCTTTGCCAACATACAGATT-3',通过PCR扩增ALS基因。PCR扩增体系为:DNA模板1 μL、10×Buffer 5 μL、25 mmol/L MgSO₄ 2 μL、2 mmol/L dNTPs 5 μL、10 μmol/L Primer各1.5 μL、1 U/μL KOD-Plus 1 μL,加水至50 μL。PCR扩增程序:94℃预变性2 min,94℃变性10 s,55℃退火30 s,68℃延伸2 min,35个循环。PCR产物经过1.5%(V/W)琼脂糖凝胶电泳分离,目的条带切胶后用DNA凝胶回收

试剂盒纯化,连接到克隆载体pEASY-T1-Blunt上,然后转化感受态细胞DH5α,涂板,挑取经过验证的阳性克隆送公司测序。通过DNASTAR软件分析基因序列差异。

1.2.3 抗性效应试验 试验于2018年在上海市农业科学院庄行综合试验站进行。5月20日播种,待3叶1心期,喷施不同浓度的咪唑乙烟酸水剂进行抗性效应试验,设置6个处理,用药量分别为0(CK)、750 mL/hm²、1500 mL/hm²、2250 mL/hm²、3000 mL/hm²和3750 mL/hm²,以不抗咪唑啉酮类除草剂的品种旱优73为对照,均匀喷洒至叶面。喷药2周后,按处理浓度分别移栽,小区面积20 m²。待成熟时,每个小区取10穴,测定株高、穗数、穗长、穗粒数、结实率和产量等农艺性状。

1.2.4 数据分析 通过SPSS 17.0软件进行数据方差分析,采用Duncan's法检验平均数间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 抗性材料的获得

2016-2018年对30570份材料进行喷施咪唑啉酮类除草剂筛选,2016年发现1份材料(编号R16-4)表现出抗性(图1),收种后在海南种植有分离,连续3年对抗性材料进行自交纯合,选择基本农艺性状优良、生育期适中的单株自交繁殖。每年对入选材料进行苗期的除草剂抗性鉴定。结果表明,该材料抗性性状稳定,均未发现抗性性状的分离。最终获得1份稳定抗咪唑啉酮类除草剂的株系。该材料来源于水稻导入系,为偏粳型,生育期为132 d,株高为83.5 cm,穗长为18.3 cm,穗粒数为91.2粒,千粒重为21.8 g,结实率为89.0%,平均单株穗数为10.2个,株型紧凑适中,叶色淡绿,分蘖力较强。



图1 咪唑啉酮类除草剂处理后抗、感材料的表现
Fig. 1 Phenotype of rice genotypes that are resistant and susceptible upon spraying imidazolinone herbicides

2.2 抗性材料 ALS 基因序列

水稻 ALS 基因没有内含子, 只有一个外显子, CDS 全长为 1935 bp, 编码 644 个氨基酸^[2]。利用引物 ALS F 和 ALS R 对抗除草剂材料的 ALS 基因进行克隆和序列分析, 与感除草剂籼稻品种 9311 的 ALS

基因编码区序列比对结果发现, 抗除草剂材料与 9311 之间存在 8 处碱基变异, 有 6 处错义突变导致氨基酸发生改变, 分别在第 25、31、113、604、627 和 643 位氨基酸位点, 其中第 1880 位的 G/A 突变导致第 627 位氨基酸由丝氨酸突变为天冬酰胺(图 2)。



图 2 抗除草剂材料 ALS 基因编码氨基酸序列的比对
Fig.2 Pairwise alignment of amino acid sequences encoded by the ALS gene in two genotypes

2.3 抗性材料的抗性效应

抗性效应结果表明, 抗性材料对咪唑啉酮类除草剂有较强的抗性, 但随着喷药浓度增加, 对水稻的产量有显著影响(表 1)。在低浓度(750 mL/hm² 和 1500 mL/hm²) 处理下, 抗性材料的株高、每穴穗数、每

穗总粒数、结实率、单株产量均无显著差异, 但在高浓度(2250 mL/hm²、3000 mL/hm² 和 3750 mL/hm²) 处理下, 每穴穗数和单株产量差异显著, 由此可见, 高浓度咪唑乙烟酸处理对抗性水稻植株的产量有一定的影响。

表 1 不同浓度咪唑乙烟酸处理对抗性材料农艺性状的影响

Table 1 Effect of different herbicide concentrations on agronomic traits of the new rice germplasm

咪唑乙烟酸浓度 (mL/hm ²) Herbicide concentrations	株高 (cm) Plant height	穗长 (cm) Spikelet length	每穴穗数 No. of panicles per hill	每穗总粒数 No. of grains per panicle	结实率 (%) Seed set rate	千粒重 (g) 1000-seed weight	单株产量 (g) Yield per plant
0	86.1a	19.5a	10.7a	92.7a	86.7a	24.9a	21.1a
750	86.3a	19.4a	10.8a	92.4a	85.8a	24.4a	21.6a
1500	85.3a	18.9a	10.4a	91.9a	86.1a	24.5a	20.4a
2250	85.2a	19.8a	9.8ab	82.3b	85.6a	23.3ab	16.2b
3000	85.1a	18.9a	6.7c	81.9ab	80.7ab	22.5b	10.2c
3750	85.5a	18.3a	5.4d	81.8b	67.5b	21.9b	6.6d

不同小写字母表示各处理在 $P<0.05$ 水平上差异显著
Different lowercase letters in the table indicate significant differences ($P < 0.05$ by LSD test) among treatments

3 讨论

随着农村劳动力向城市转移,农业供给侧结构性改革逐步深入,要求农业生产向节本增效发展,水稻生产方式也向轻简化、机械化方向转变,水稻直播显然更符合目前生产发展趋势,由于直播稻田的杂草特别是杂草稻的危害日趋严重,已成为影响水稻产量和品质的重要因素。当前主要采用的是化学除草的方式,但一些恶性杂草或者与作物亲缘关系很近的杂草很难通过常规的除草剂防除,推广特定除草剂和抗除草剂作物的组合应用能有效解决这个问题。国内外科学家做了大量的抗除草剂水稻种质资源筛选鉴定,只有抗草甘膦、草铵膦和咪唑啉酮类除草剂水稻获得了一定的进展^[6]。由于抗草甘膦和抗草铵膦水稻主要是通过转基因技术获得,在目前的政策条件下推广应用受到一些限制。抗咪唑啉酮类的水稻则主要是通过诱变或者自然突变等传统育种方法获得,更容易被接受。咪唑啉酮类除草剂主要是防除在大豆、花生等干旱或半干旱田块的禾本科和阔叶类杂草,具有高效、低毒等特点,美国、加拿大和巴西推广的抗咪唑啉酮类除草剂的水稻品种在防除稻田杂草方面展现出了良好的应用前景^[7]。乙酰乳酸合成酶负责催化合成细胞中的支链氨基酸,ALS 基因碱基突变造成氨基酸残基位点变化,导致靶蛋白发生修饰,进而引起除草剂与 ALS 酶结合方式的变化是水稻产生靶标抗性的重要方式之一^[2,8]。目前,水稻中已报道的能产生除草剂抗性的突变位点主要包括第 96、171、548、627 和 628 位氨基酸,这些位点大多分布在 ALS 蛋白高度保守区的 5 个结构域中^[3,9-10]。Rajguru 等^[11]研究表明,第 1880 位点的 G/A 突变导致 ALS 基因第 627 位氨基酸发生改变,使得咪唑啉酮类除草剂不能作用于 ALS 蛋白,植株进而对除草剂表现出抗性。本试验筛选获得的抗性材料,通过测序发现是由于 ALS 基因第 627 位氨基酸突变为天冬酰胺,对咪唑啉酮类除草剂表现出稳定的抗性,利用该抗性材料和不抗除草剂水稻品种杂交,发现 F₁ 也表现出对咪唑啉酮类除草剂的抗性,由于其非转基因、显性抗性的特点,展现出广阔的应用前景。

咪唑啉酮类除草剂在土壤中有一定的残留,不同的轮作作物对咪唑啉酮类除草剂的耐受能力也有差异^[12]。范方军等^[13]在连续使用咪唑啉酮类除草剂咪草烟的田块调查水稻和小麦的生长情况,发现咪草烟的当季残留会影响水稻生长,但对后茬小麦

生产几乎没有影响。为了在生产上避免除草剂残留对轮作的影响,应该继续研究科学、合理的喷施浓度,最大程度地降低残留,提高药效;同时,加强其他抗除草剂作物的筛选鉴定,目前我国在玉米、油菜、谷子等作物中已经筛选鉴定出抗性资源,并在育种中得以利用^[14-17]。

节水抗旱稻是指既具有水稻的高产优质特性,又具有旱稻的节水抗旱特性的一种新的栽培稻品种类型^[18]。由于节水抗旱稻比一般水稻根系更加发达,抗旱性较强,适应旱直播(机条播和撒播)、水直播等多种播种方式,特别是在旱直播旱管栽培模式下更能体现其节本增效的特点,发展节水抗旱稻可改变传统的水稻种植方式,实现资源节约、环境友好。在节水抗旱稻推广应用的过程中急需解决直播稻田杂草防治的问题。节水抗旱稻旱直播旱管下的杂草草相与旱地豆科杂草类似,能提高咪唑啉酮类除草剂的杂草防治效果,因此培育抗咪唑啉酮类除草剂节水抗旱稻新品种是旱直播稻田防治杂草经济有效的途径之一。本研究发现的抗除草剂新材料,为开展节水抗旱稻抗除草剂育种奠定了种质基础,接下来需进一步探明该材料对除草剂的抗性效应,建立高效、便捷的抗性鉴定技术;通过与节水抗旱稻骨干亲本杂交、回交,开发可应用的功能标记,结合抗性筛选,培育抗除草剂的节水抗旱稻新品种。

参考文献

- [1] Tan S, Richard R E, Mark L D, Bijay K S, Dale L S. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science*, 2005, 61: 246-257
- [2] Jennifer A M, Pang S S, Jack K S, Luke W G, Ronald G D. Her-bicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 569-573
- [3] Boutsalis P, Karotam J, Powles S B. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase - inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pest Management Science*, 1999, 55 (5): 507-516
- [4] 苏少泉. 抗咪唑啉酮类除草剂作物的发展与未来. *现代农药*, 2006, 5 (1): 1-4
Su S Q. The development and future of imidazolinone herbicide-resistant crops. *Modern Agrochemicals*, 2006, 5 (1): 1-4
- [5] Jr S C, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 1993, 14 (5): 748-750
- [6] 肖本泽,张征锋,何亮,龚耀,赵爽. 抗除草剂杂交籼稻亲本的配合力分析. *植物遗传资源学报*, 2012, 13 (4): 562-570
Xiao B Z, Zhang Z F, He L, Gong Y, Zhao S. Combining ability analysis of parents of herbicide-resistant indica hybrids.

- Journal of Plant Genetic Resource, 2012, 13 (4): 562-570
- [7] Nikolaos S K, Nieves C, Ana A, Eleftherohorinos I G. Red rice (*Oryza sativa*) cross-resistance to imidazolinone herbicides used in resistant rice cultivars grown in northern Greece. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2013, 105: 177-183
- [8] Webster E P, Masson J A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone tolerant rice. Weed Science, 2001, 49: 652-657
- [9] Goulart I C, Matzenbacher F O, Merotto A J. Differential germination pattern of rice cultivars resistant to imidazolinone herbicides carrying different acetolactate synthase gene mutations. Weed Research, 2012, 52: 224-232
- [10] Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, Kawai K, Toriyama K. A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice. Plant Molecular Biology, 2007, 64: 219-224
- [11] Rajguru S N, Burgos N R, Shivrain V K, Stewart J M. Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. Weed Science, 2005, 53: 567-577
- [12] 黄春艳, 陈铁保, 王宇, 孙宝宏, 杨绍义. 咪唑啉酮类除草剂对后茬作物安全性研究初报. 农药学报, 2001, 3 (2): 29-34
Huang C Y, Chen T B, Wang Y, Sun B H, Yang S Y. Study on safety of imidazolinone herbicides to succeeding crops. Chinese Journal of Pesticide Science, 2001, 3 (2): 29-34
- [13] 范方军, 王芳权, 李文奇, 王军, 朱金燕, 许杨, 仲维功, 杨杰. 抗咪草烟水稻资源的筛选. 中国稻米, 2018, 24 (6): 108-109
Fan F J, Wang F Q, Li W Q, Wang J, Zhu J Y, Xu Y, Zhong W G, Yang J. Screening of imazethapyr-resistant rice resources. China Rice, 2018, 24 (6): 108-109
- [14] Tan S, Dahmer M L, Singh B K, Shaner D L. Imidazolinonetolerant crops: history, current status and future. Pest Management Science, 2010, 61: 246-257
- [15] 师志刚, 夏雪岩, 刘正理, 程汝宏. 谷子抗咪唑乙烟酸新种质的初步研究. 河北农业科学, 2010, 14 (11): 133-134, 136
Shi Z G, Xia X Y, Liu Z L, Cheng R H. Preliminary study on new imazethapyr resistant foxtail millet germplasm. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2010, 14 (11): 133-134, 136
- [16] 高建芹, 浦惠明, 戚存扣, 张洁夫, 龙卫华, 胡茂龙, 陈松, 陈新军, 陈锋, 顾慧. 抗咪唑啉酮油菜种质的发现与鉴定. 植物遗传资源学报, 2010, 11 (3): 369-373
Gao J Q, Pu H M, Qi C K, Zhang J F, Long W H, Hu M L, Chen S, Chen X J, Chen F, Gu H. Identification of imidazolidone-resistant oilseed rape mutant. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11 (3): 369-373
- [17] 李燕敏, 祁显涛, 刘昌林, 刘方, 谢传晓. 除草剂抗性农作物育种研究进展. 作物杂志, 2017 (2): 1-6
Li Y M, Qi X T, Liu C L, Liu F, Xie C X. Progress of crop breeding on resistance to herbicides. Crops, 2017 (2): 1-6
- [18] Luo L J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. Journal of Experimental Botany, 2010, 61: 3509-3517