

邹拓,杜琪,耿雷跃,等. 抗除草剂水稻耐药性及后代筛选方法的研究[J]. 江苏农业科学,2022,50(13):136-140.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.13.022

# 抗除草剂水稻耐药性及后代筛选方法的研究

邹拓,杜琪,耿雷跃,张薇,孟令启,张启星

(河北省农林科学院滨海农业研究所/唐山市水稻育种重点实验室,河北唐山 063299)

**摘要:** 为了解抗除草剂水稻与常规水稻对咪唑啉酮类除草剂的耐药性差异以及探索一种针对抗除草剂水稻育种过程中快速筛选杂交后代抗性材料的方法。通过配制不同浓度的咪唑乙烟酸溶液对抗除草剂水稻品种滨稻 K1 及常规水稻品种垦育 60 的根与叶片喷施后,测量计算其生长率及浸种后计算种子出苗率。结果表明,常规水稻的根和叶片的生长率及出苗率随着咪唑乙烟酸溶液浓度的提高迅速降低,并在较低浓度下停止生长和出苗;抗除草剂水稻的根和叶片的生长率及出苗率随着咪唑乙烟酸溶液浓度的提高先缓慢均匀降低,达到较高浓度后快速下降直至停止生长和出苗。分析数据得出抗除草剂水稻的种子、根和叶片对除草剂的耐药能力分别是常规水稻的 20、90、15.7 倍,抗除草剂水稻种子、根和叶对除草剂的耐力极限浓度分别为 1.000%、0.900%、1.100%,2 种水稻的不同部位间的耐药能力均为叶片 > 种子 > 根;利用 0.03% 咪唑乙烟酸溶液浸种 72 h,或用 0.07% 咪唑乙烟酸溶液在水稻 3 叶 1 心期进行叶面喷施,可快速杀死全部不具有除草剂抗性的后代材料。

**关键词:** 水稻;抗除草剂;后代筛选;耐药性;咪唑乙烟酸

**中图分类号:** S511.034 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)13-0136-05

水稻(*Oryza sativa* L.)是我国乃至世界上最重要的粮食作物之一。水稻的稳产、高产对保障世界粮食安全具有重要意义。近年来,随着我国新型城镇化和现代农业的发展,水稻生产正在向集约化、规模化、机械化发展,机插秧、直播等轻简栽培已成为发展趋势。随着机种、机收面积的增加,导致田间的杂草和杂草稻更容易繁殖<sup>[1]</sup>。

在我国,水稻播种面积中杂草稻实际发生面积约占 20%,产量平均损失在 10% 左右,年损失超过 100 亿元,被称为“水稻杀手”。其中,江苏省为重灾区,发生量大,危害最严重,有的田块甚至颗粒无收;杂草稻发生面积 66.7 万  $\text{hm}^2$ ,年损失 67 万 t,造成的直接经济损失在 20 亿元左右<sup>[2]</sup>。杂草稻已经

严重危及国家粮食安全。

国内主要通过深耕、灌水诱发灭杀、轮作换茬、人工拔除等方法来防治杂草稻。上述方法存在防治措施成本高、效率低且不易实施等问题<sup>[3]</sup>。利用除草剂治理杂草稻是一条最有效的途径。但由于杂草稻与栽培稻的生理过程相似<sup>[4]</sup>,至今还没有研究出专门针对杂草稻的选择性除草剂,使杂草稻的防治难于其他杂草。因此,亟需培育抗除草剂水稻,以便大田杂草稻的控制<sup>[5]</sup>。

抗咪唑啉酮类除草剂水稻种质是由于乙酰乳酸合成酶(ALS)发生碱基变异,导致 ALS 蛋白的结构变化,降低对咪唑啉酮类除草剂的敏感性<sup>[6]</sup>。此类抗除草剂水稻种质是从自然变异株以及人工诱变群体中筛选出来的,可以在国内生产中应用<sup>[7]</sup>。咪唑啉酮类除草剂能有效防除一年生禾本科杂草、阔叶杂草及杂草稻,适用于水稻田间杂草的防治。

目前抗咪唑啉酮类除草剂水稻在美国和中南美洲广泛种植,美国 RiceTec 公司目前主推的品种有 Clearfield XL729、Clearfield XL745、Clearfield XP756 和 Clearfield XP4534,其均为非转基因抗除草剂的杂交水稻。RiceTec 公司的抗除草剂杂交水稻占美国杂交稻市场份额的 76%,占中南美洲市场份额的 90%<sup>[8]</sup>。国内抗咪唑啉酮类除草剂水稻的育种进度较慢,目前报道较多的为天津市水稻所育成

收稿日期:2021-10-08

基金项目:河北省唐山市科技计划(编号:19150242E);河北省杂粮杂豆现代种业科技创新团队项目(编号:21326305D-2);河北省现代农业产业技术体系小麦产业创新团队项目(编号:HBCT2018010208);河北省农林科学院农业科技创新专项(编号:2022KJCXZX-BHS-1);河北省重点研发计划(编号:19226340D)。

作者简介:邹拓(1992—),男,河北唐山人,硕士,助理研究员,从事抗除草剂和优质水稻育种研究。E-mail:549282738@qq.com。

通信作者:张薇,助理研究员,从事水稻高产育种研究。E-mail:746329017@qq.com。

的金粳 818,它是利用津稻 9618 和津稻 1007 杂交经多年系谱法选育而成的常规品种,在水稻资源进行除草剂筛选过程中发现它具有咪唑啉酮除草剂抗性<sup>[9]</sup>。对其基因序列进行分析发现 ALS 的基因编码区第 1 880 nt 由 G 突变为 A,使第 627 位的丝氨酸突变为天冬酰胺,导致水稻对咪唑乙烟酸除草剂不敏感,表现为抗除草剂<sup>[10]</sup>。

目前,非转基因抗除草剂水稻品种远远不能满足我国市场以及大田生产的需要,水稻抗除草剂性状已愈来愈受到水稻育种家和种业公司的重视。培育非转基因抗除草剂水稻应是目前水稻育种工作的一个重要部分。为了加速抗 ALS 抑制剂类除草剂水稻种质在新品种选育过程中的应用,先后有学者开发了针对这些 ALS 突变型的功能标记<sup>[11-12]</sup>。但利用分子标记选择需等杂交分离群体移栽至本田后单株取样检测基因,再去除无抗性基因单株后进行选种,费时费力,也容易出现假阳性。

为了解抗除草剂水稻的耐药能力及方便抗除草剂水稻育种过程中对后代材料的抗除草剂性状的筛选,本研究通过比较非转基因抗除草剂水稻与常规水稻的根、叶和种子对除草剂(咪唑乙烟酸)的耐药能力,明确抗除草剂水稻与常规水稻的抗性差异、抗性极限并找到一种利用合适的除草剂浓度浸种和苗期喷施,快速筛选抗除草剂后代材料的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2020 年 3—9 月在河北省农林科学院滨海农业研究所实验基地智能温室进行,试验中药品种配制及数据收集和分析在河北省农林科学院滨海农业研究所综合实验室完成。

本研究中水稻试验材料为滨稻 K1(河北省农林科学院滨海农业研究所选育的抗除草剂品系,品种来源为金粳 818 × 垦育 60)及垦育 60(非抗除草剂水稻);除草剂为咪唑乙烟酸(5% 水剂,商品名为普施特,由巴斯夫欧洲公司生产)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 抗除草剂水稻与常规水稻不同部位耐药性研究 分析抗除草剂水稻与常规稻的根和叶对不同浓度的咪唑乙烟酸的耐受性,设置 0、0.001%、0.003%、0.005%、0.007%、0.009%、0.010%、0.030%、0.050%、0.070%、0.090%、0.900%、1.100% 这 13 个除草剂浓度(在保持除草剂浓度的

条件下,加入一定量的水稻营养液)。在培养皿中利用适量浓度的水稻营养液让种子发芽,发芽 7 d 后把 1 叶 1 心的水稻苗移栽入盛有沙土的培养皿中,灌根或喷叶不同浓度的咪唑乙烟酸溶液,喷叶时沙土表面覆盖塑料薄膜,防止除草剂滴落土中,对根有影响,每天记录根和叶的生长情况。所有指标最终以生长率作为衡量指标,其计算方法为生长率 =  $(L_n - L_0) / L_0 \times 100\%$ 。  $L_0$  为第 7 天根或叶的长度,  $L_n$  为处理后第几天根或叶的长度。

1.2.2 除草剂浓度及浸种时间对水稻种子出苗率的影响 为明确不同除草剂浓度和浸种时间对抗除草剂品种与普通品种水稻种子发芽的影响。设置 0、0.000 5%、0.001 0%、0.003 0%、0.005 0%、0.007 0%、0.009 0%、0.010 0%、0.030 0%、0.050 0%、0.070 0%、0.090 0%、0.100 0%、0.300 0%、0.500 0%、0.700 0%、0.900 0% 和 1.000 0% 这 18 个咪唑乙烟酸除草剂溶液浓度梯度和 48、72、96 h 的浸种时间梯度进行试验,计算不同梯度下的出苗率。

## 2 结果与分析

### 2.1 滨稻 K1 与垦育 60 的根在不同浓度除草剂浸泡下的生长率

由图 1 可知,滨稻 K1 在不同浓度的除草剂下第 8 天的生长率为 15.99% ~ 68.24%。在所有浓度间,0.001% 浓度处理与对照相比,滨稻 K1 的根在第 8 天的生长率降低最多,下降 14.1%。除草剂浓度在 0.001% ~ 0.050% 范围内,根的生长率均匀下降,第 8 天的生长率保持在 30% 以上,且具有继续伸长的势头。从 0.070% ~ 0.090% 浓度下,生长率开始明显降低,分别为 22.6%、16.0%。继续增大浓度直至 0.900%,抗除草剂水稻的根部几乎不再生长,施药后第 8 天与第 2 天根的长度无明显伸长,第 8 天的生长率小于 5%。

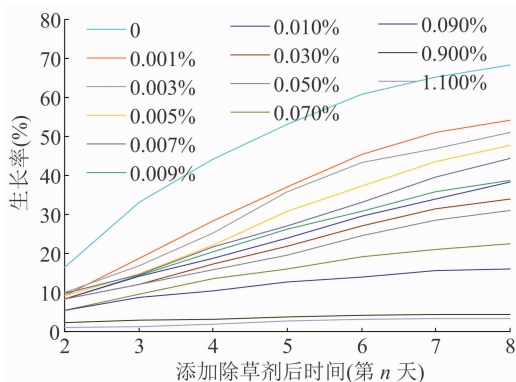


图1 13个浓度下第2天至第8天滨稻 K1 根的生长率

试验中不同浓度的除草剂下,垦育 60 的根在施药第 8 天的生长率范围是 0.2% ~ 30.3%。所有除草剂浓度间,0.001% 浓度处理与对照相比,垦育 60 的根在第 8 天的生长率变化最大,下降 16.4%。在除草剂浓度为 0.001% ~ 0.005% 的条件下,垦育 60 的根仍具有一定的伸长量,在第 8 天的生长率分别为 13.9%、12.1%、9.1%。在 0.010% ~ 0.090% 的除草剂浓度下,垦育 60 的根几乎不再生长,根部开始溃烂死亡,施药后第 8 天与第 2 天根的长度无明显伸长,第 8 天的生长率均小于 2% (图 2)。

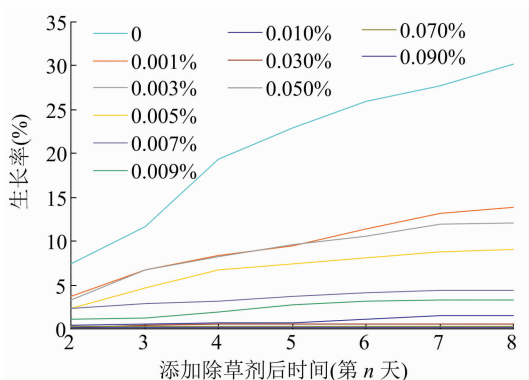


图2 11个浓度下第2天至第8天垦育60根的生长率

## 2.2 抗除草剂水稻与垦育60的叶片在不同除草剂浓度喷施下的生长率

滨稻 K1 在试验设定浓度下,叶片在第 8 天的生长率从 118.1% 降至 26.5%,滨稻 K1 叶片的生长率在 0.001% ~ 0.007%、0.009% ~ 0.030% 以及 0.050% ~ 0.090% 这 3 个除草剂浓度区间内均匀下降。所有浓度间,0.007% 与 0.009% 相比,滨稻 K1 叶片的生长率下降最大,降低 24.1%。在除草剂浓度为 0.090% 时,滨稻 K1 的叶片仍具有一定的生长势头,施药后第 8 天较第 2 天伸长 12.0%。继续增加除草剂浓度到 1.1% 后,滨稻 K1 的叶片停止了生长 (图 3)。

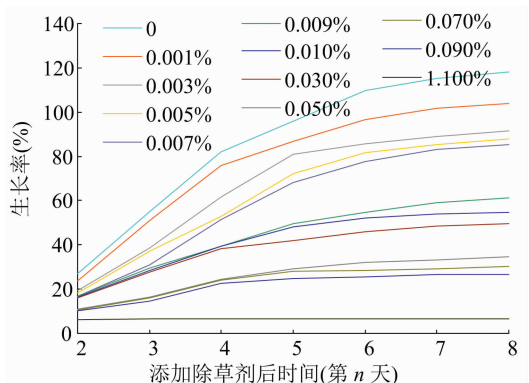


图3 11个浓度下第2天至第8天滨稻K1叶的生长率

试验中利用不同浓度的除草剂对水稻叶面进行喷施,垦育 60 的叶片在施药后第 8 天生长率从 171.6% 降至 16.9%。所有浓度间,0.001% 处理浓度喷施下叶片的生长率与对照相比在第 8 天下降最快,降低了 77.1%。在除草剂浓度为 0.001%、0.003% 时,垦育 60 的叶片仍有较强的伸长势头,施药第 8 天比第 2 天分别伸长 58.5%、48.3%。在除草剂浓度大于 0.070% 后,叶片不再生长,叶片黄死,0.070%、0.090% 浓度处理施药第 8 天较第 2 天叶仅伸长了 6.6%、4.2% (图 4)。

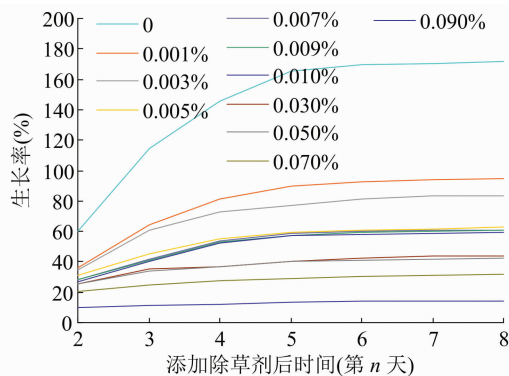


图4 11个浓度下第2天至第8天垦育60叶的生长率

## 2.3 不同浓度的咪唑乙烟酸溶液及时间浸种对抗除草剂水稻与普通水稻出苗率的影响

对滨稻 K1 和垦育 60 使用不同浓度的咪唑乙烟酸溶液浸种 48 h。播种 20 d 后 (对照苗长至 3 叶 1 心时) 计算出苗率。垦育 60 在除草剂浓度为 0.001 0% 时出苗率开始降低,在 0.050 0% 的浓度下已经不再出苗,可认定种子全部失活。滨稻 K1 在除草剂浓度为 0.050 0% 时,出苗率开始下降,直至浓度大于 0.100 0% 时,出苗率已经小于 50%,增大除草剂浓度直至 1.000 0%,抗除草剂水稻仍有 1% 的种子可以出苗 (表 1)。观察 2 种水稻长势,普通水稻在除草剂浓度大于 0.005 0%,抗除草剂水稻在除草剂浓度大于 0.070 0% 时,水稻秧苗与对照相比明显变矮并出现黄叶 (图 5)。

进一步利用 0.01%、0.03%、0.05%、0.07% 等 4 个浓度的咪唑乙烟酸进行浸种 48、72、96 h,分析不同浸种时间对出苗率的影响。结果 (表 2) 表明,利用 0.03% 的咪唑乙烟酸浸种 72 h,普通品种全部不出苗,抗除草剂品种出苗正常、整齐,秧苗无黄叶及变矮现象。

## 2.4 2种水稻的种子及根和叶对咪唑乙烟酸的耐药性分析

滨稻 K1 与垦育 60 在不同浓度除草剂溶液下浸



表 1 不同浓度浸种下 2 个水稻品种出苗率

咪唑乙烟酸溶液浓度 (%)	出苗率(%)	
	垦育 60	滨稻 K1
0	100	100
0.000 5	100	100
0.001 0	80	100
0.003 0	74	100
0.005 0	56	100
0.007 0	44	100
0.009 0	21	100
0.010 0	10	100
0.030 0	2	100
0.050 0	0	93
0.070 0	0	76
0.090 0	0	69
0.100 0	0	52
0.300 0	0	25
0.500 0	0	16
0.700 0	0	15
0.900 0	0	3
1.000 0	0	1

种 48 h,2 种水稻种子分别在 0.050 0%、0.001 0% 的浓度下开始降低出芽率,普通水稻的种子对除草剂的敏感度是抗除草剂水稻种子的 50 倍。在大于 0.050 0% 的浓度下垦育 60 不再出苗,种子全部失活,而抗除草剂水稻品种滨稻 K1 在 1.000 0% 浓度下仍有 1% 左右的种子出苗,因此抗除草剂水稻的种子最大耐药量分别是常规水稻的 20 倍以上。

滨稻 K1 与垦育 60 的根分别在除草剂浓度为 0.900%、0.010% 下停止生长,滨稻 K1 根的耐药能力是垦育 60 的 90 倍。2 种水稻的叶片分别在 1.100%、0.070% 的除草剂浓度下逐渐死亡,滨稻 K1 叶片的耐药能力是垦育 60 的 15.7 倍。

通过以上数据的比较可以得出,同一种水稻中叶的耐药能力高于根的耐药能力,种子的耐药能力介于根和叶片之间。利用浓度为 0.03% 的咪唑乙烟酸溶液浸种 72 h 或 0.07% 的咪唑乙烟酸溶液对稻苗进行喷施可杀死全部不抗除草剂的材料,抗性材料可以正常生长。



上: 垦育 60, 下: 滨稻 K1

图5 不同浓度浸种下 2 个水稻品种出苗情况

表 2 4 个浓度梯度 3 个时间梯度下 2 个水稻品种の出苗率

浸种时间 (h)	咪唑乙烟酸溶液浓度 (%)	出苗率(%)	
		垦育 60	滨稻 K1
48	0.01	22	100
	0.03	11	100
	0.05	4	100
	0.07	0	90
72	0.01	5	100
	0.03	0	100
	0.05	0	90
	0.07	0	80
96	0.01	2	100
	0.03	0	82
	0.05	0	80
	0.07	0	70

3 讨论与结论

咪唑啉酮类除草剂是目前应用较广泛的一类除草剂,具有杀草谱广、用量低、除草效率高等优点,深受广大农户喜爱<sup>[13]</sup>。目前绝大部分抗 ALS 抑制剂作物的抗性机制是源于 ALS 基因碱基突变造成氨基酸残基位点变异,引起 ALS 抑制剂(除草剂)与 ALS 蛋白结合性降低,从而使得突变体对该除草剂体现为不敏感或耐受性<sup>[14-15]</sup>。

对具有 ALS 基因抗除草剂水稻,前人大多开展了 ALS 基因分子标记的开发、碱基突变位点变异等分子方面的研究。鲜有针对抗除草剂水稻对比常规水稻对咪唑啉酮类除草剂耐药性表型的研究。本研究通过设定一系列的除草剂浓度梯度对 2 种水

稻的种子、根和叶片进行浸种或喷施,发现抗除草剂水稻与常规水稻的种子、根和叶片对除草剂的反应是一致的,耐药能力均为叶片 > 种子 > 根。2 种水稻之间,抗除草剂水稻的种子、根和叶片对除草剂的耐药能力分别是常规水稻的 20、90、15.7 倍。抗除草剂水稻种子、根和叶片对咪唑乙烟酸的耐力极限分别为 1.000%、0.900%、1.100%,因此在田间施药过程中注意不要超过此浓度,以防水稻出现药害。

近年来我国育种家不断通过诱变等方法筛选具有 *ALS* 变异基因的抗除草剂种质,例如深圳兴旺生物种业有限公司用甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变黄华占和黄丝占,以咪唑啉酮类除草剂筛选,获得 3 个抗性突变体<sup>[16]</sup>。江苏省农业科学院利用甲咪唑烟酸筛选经 EMS 诱变的多个粳稻、籼稻品种,获得多个抗除草剂突变体<sup>[17-19]</sup>。但是育成品种的数量及类型仍然不能满足种子市场及水稻生产的需要,急需加快抗除草剂水稻品种的选育。利用除草剂溶液浸泡作物种子验证其是否对应除草剂具有抗性的方法前人已经在棉花和谷子上进行了尝试,效果明显<sup>[20-21]</sup>。

本研究利用抗除草剂水稻与常规水稻种子、根和叶片对除草剂耐药性的差异,在种子萌发期及苗期通过表型筛选快速完成对具有抗除草剂基因后代材料的选择。主要方法为利用 0.03% 咪唑乙烟酸溶液浸种 72 h,或用 0.07% 咪唑乙烟酸溶液在水稻 3 叶 1 心期喷施,可全部杀死不具有除草剂抗性的后代材料。此种方法较目前流行的分子标记辅助选择具有更高的效率,在正常的播种育秧期间即可完成对抗性材料的筛选。本研究结果规范了除草剂的使用剂量以防止田间药害的产生,加速抗除草剂水稻后代群体抗除草剂性状的鉴定及筛选,提高了抗除草剂水稻的育种效率。

#### 参考文献:

- [1] 王文霞,曾研华,曾勇军,等. 不同直播方式对南方稻田杂草发生及早籼稻产量的影响[J]. 核农学报,2018,32(3):555-560.
- [2] 王渭霞,朱廷恒,邵国胜,等. 杂草稻的分类、起源及利用研究进展[J]. 杂草科学,2005,23(2):1-5.
- [3] 王宝雷,李正名,赵卫光,等. 酮醇酸还原异构酶抑制剂的设计、合成及除草活性[J]. 农药学报,2006,8(1):14-19.
- [4] 曹塬程,王秋霞,郭美霞. 当前除草剂的应用与面临的挑战[J]. 植物保护与现代农业,2008,6(2):294-501.
- [5] Fartyal D, Agarwal A, James D, et al. Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management[J]. Scientific Reports,2018,8:11598.
- [6] 吴云雨,肖宁,余玲,等. 我国抗除草剂水稻种质创制研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2021,22(4):890-899.
- [7] 陈天子,余月,凌溪铁,等. EMS 诱变水稻创制抗咪唑啉酮除草剂种质[J]. 核农学报,2021,35(2):253-261.
- [8] 肖国樱,陈芬,孟秋成,等. 我国转基因抗除草剂水稻的生态风险与控制[J]. 农业生物技术学报,2015,23(1):1-11.
- [9] 范方军,王芳权,李文奇,等. 抗咪唑草烟水稻资源的筛选[J]. 中国稻米,2018,24(6):108-109.
- [10] 费云燕,杨杰,范方军,等. 水稻咪唑草烟抗性的遗传分析及其紧密连锁分子标记的筛选与应用[J]. 作物学报,2018,44(5):716-722.
- [11] 陈涛,张善磊,赵凌,等. *ALS* 抑制剂类除草剂抗性水稻功能标记的开发与验证[J]. 中国水稻科学,2018,32(2):137-145.
- [12] 王芳权,杨杰,范方军,等. 水稻抗咪唑啉酮类除草剂基因 *ALS* 功能标记的开发与应用[J]. 作物学报,2018,44(3):324-331.
- [13] Tan S Y, Evans R R, Dahmer M L, et al. Imidazolinone - tolerant crops: history, current status and future [J]. Pest Management Science,2005,61(3):246-257.
- [14] Yu Q, Powles S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding [J]. Pest Management Science, 2014, 70(9):1340-1350.
- [15] 胡茂龙,浦惠明,高建芹,等. 油菜乙酰乳酸合成酶抑制剂类除草剂抗性突变体 M9 的遗传和基因克隆[J]. 中国农业科学,2012,45(20):4326-4334.
- [16] 陈竹锋,王承旭,柳威,等. 水稻抗除草剂蛋白及其在植物育种中的应用:CN102586215B[P]. 2013-04-17.
- [17] 张保龙,陈天子,王金彦,等. 一种小麦 *ALS* 突变型基因及其蛋白在抗除草剂方面的应用:CN106755019B[P]. 2019-11-08.
- [18] 张保龙,陈天子,王金彦,等. 粳稻 *ALS* 突变型基因及其蛋白在抗除草剂方面的应用:CN106868027B[P]. 2020-02-07.
- [19] 张保龙,王金彦,凌溪铁,等. 使植物具有除草剂抗性的水稻 *ALS* 突变型蛋白及其应用:CN107217044A[P]. 2017-08-25.
- [20] 付远志,李成奇,王清连,等. 利用种子发芽试验检测抗草甘膦棉花新品系[J]. 种子,2011,30(9):102-103.
- [21] 吕建珍,马建萍,独俊娥,等. 抗拿扑净除草剂谷子快速鉴定方法分析[J]. 种子,2019,38(2):105-107.