

抗广谱除草剂 pursuit 水稻的抗性遗传分析和利用^{*}

段发平, 黎垣庆, 段俊, 范树国, 白成科, 梁承邨

(中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘要: 以4个恢复系测64、明恢63、特青和02428为母本, 分别与抗除草剂 pursuit (普杀特) 水稻品种 PT2 杂交, 遗传分析表明, PT2 的抗性遗传符合一对显性核基因的模式。通过杂交一代和回交二代已将抗性基因转移到恢复系, 初步培育出4个抗性恢复系测64-P、明恢63-P、特青-P和02428-P; 它们与不育系杂交, 选育到4个杂交稻组合。考种结果发现, 抗除草剂组合基本上能保持原组合的产量水平, 苗期喷药可完全淘汰假杂种。利用这项技术可望解决三系、两系或化学杀雄杂交稻制种过程中出现的纯度问题, 且有利于新杂交稻组合的选育。对该项技术在生产上的应用前景和存在问题进行探讨。

关键词: 除草剂; pursuit; 水稻; 遗传; 利用

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 03-0067-04

杂交水稻种子纯度问题一直是水稻生产中被高度关注的问题之一^[1], 目前国内许多研究集中在采用除草剂草丁膦 (Liberty 或 Basta) 及转 bar 基因水稻来解决水稻杂交种的纯度问题^[2,3]。将来单一 bar 基因品种或组合在生产上应用, 多年连续喷施同一种除草剂草丁膦, 有可能加剧田间杂草群落组成的变化, 加快抗性杂草出现的频率。广谱除草剂 pursuit (普杀特) 是一种高效和低毒的咪唑酮类 (imidazolinones) 除草剂。咪唑酮类除草剂的作用靶标是植物体内催化亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸合成的关键酶—乙酰乳酸合成酶 (acetolhydroxyacid synthase, AHAS)^[4,5]。美国氰胺公司 (American Cyanamid) 已经成功获得抗咪唑酮的玉米、油菜、甜菜、小麦和水稻, 其中抗咪唑酮玉米杂交种已经在美国大面积种植^[6]。1998年本研究室得到美国国家水稻研究中心提供的抗除草剂 pursuit (普杀特) 水稻品种 PT2。该品种的抗性遗传目前未见报道。为此我们研究抗 pursuit (普杀特) 水稻 PT2 的抗性遗传基础, 并与生产上优良的恢复系配制杂交组合, 期望转育出抗 pursuit (普杀特) 优良水稻恢复系, 进而选配出优良抗性杂交组合。

1 材料与方法

1.1 实验材料

抗除草剂水稻 PT2; 恢复系测64、明恢63、特青和02428; 不育系珍汕97A和培矮64S。其中抗

除草剂水稻 PT2 是美国氰胺公司 (American Cyanamid) 通过组培诱变获得抗 pursuit (普杀特) 的热带粳稻品系, 该品系1997年在美国水稻研究中心进行田间试验, 能够充分表达抗除草剂 (pursuit) 的特性。

1.2 实验方法

以PT2为父本, 分别与母本测64、明恢63、特青和02428配制杂交组合。播种上述各亲本和杂种一代, 3—4叶期对抗性亲本和杂种喷施0.53 mg/L pursuit 药剂 (外加1.2 mL/L表面活性剂), 3周后统计死活苗数, 将活苗移栽大田, 配制子一代的正反回交组合。盆栽上述各亲本、子二代和正反回交组合种子。苗期对抗性亲本及全部杂种喷药, 统计死活苗数, 将亲本及成活的正反交组合植株移栽大田。一方面对4个转育的抗性恢复系继续回交加代, 另一方面选取有抗性且株型、穗型等与原恢复系相类似的单株与不育系测交配组。播种测交父本和杂种, 喷药3周后, 移栽成活幼苗种植在大田里。成熟时期每种材料随机抽取10个单株进行考种。上述实验于1998—2001年在中国科学院华南植物园实验农场进行。

2 结果和分析

2.1 抗 pursuit 水稻的抗性遗传分析

喷施除草剂 pursuit 1周后, 不含抗性基因的4个母本恢复系所有植株生长受抑制, 叶尖开始枯

* 收稿日期: 2003-07-21

基金项目: 广州市科技计划资助项目 (2002 J1-C0231)

作者简介: 段发平 (1970年生), 男, 博士, 讲师; 通讯联系人: 黎垣庆, E-mail: liyuang@scih.ac.cn

萎, 3 周后整个植株萎焉死亡。而含有抗性基因杂种 F1 代及抗性亲本 PT2 植株全部成活, 正常生长直至成熟。这说明抗除草剂水稻 PT2 的抗性遗传为完全显性遗传方式 (表 1)。

表 1 恢复系、抗除草剂品种 PT2 及其杂交 F1 代对除草剂 pursuit 的表现¹⁾

Tah 1 Resistant expression to herbicide pursuit among restorer lines as female, the pursuit resistant rice PT2 as male and their F1 hybrid plants

组合	世代	总苗数	成活苗数	死亡苗数
1. 测 64/PT2	P ₁	79	0	79
	P ₂	81	81	0
	F ₁	42	42	0
2 明恢 63/PT2	P ₁	72	0	72
	P ₂	68	68	0
	F ₁	39	39	0
3 特青/PT2	P ₁	75	0	75
	P ₂	74	74	0
	F ₁	33	33	0
4 02428/PT2	P ₁	77	0	77
	P ₂	75	75	0
	F ₁	41	41	0

1) P₁= 母本, P₂= 父本, F₁= 杂种一代

组合 1、2、3、4 的抗性分离情况及适合度测验见表 2。由表可见, 喷药 3 周后, 4 个组合的 B₂ 世代植株均表现为完全抗性。其 F₂ 代成活植株与死亡植株的分离比例均接近 3 : 1, 经适合度测验符合理论期望值。其与非抗性亲本回交的 4 个 B₁ 世代中活苗与死苗的分离比经 χ^2 测验都符合 1 : 1 的理论比率。因此抗 pursuit 水稻的抗性遗传属显性单基因控制。

以组合 1、3 的 F₁ 代作为父本, 分别与其对应两个亲本进行反交试验, 苗期喷药 3 周后, 调查其死活苗数 (表 3)。F₁ 与抗性亲本反交的 2 个组合植株, 喷药试验后未发现死苗。而 F₁ 代与非抗性亲本反交的组合植株死活苗分离比接近 1 : 1, 经统计测验亦符合一对显性基因的遗传行为。说明 F₁ 代与亲本的正交和反交的抗性遗传行为表现一致的趋势, 进一步证实抗除草剂 pursuit 水稻的抗性遗传为显性单基因, 且不受细胞质的影响。

2.2 抗 pursuit 水稻恢复系的转育和表达

采用珍汕 97A 为母本与 PT2 测交, 结果发现杂种一代表现为高不育, 结实率仅为 4.2% (表 4 中未列出)。这说明美国抗除草剂品种 PT2 缺乏强恢复基因, 难以直接应用于三系水稻杂交育种上。前

表 2 抗 pursuit 水稻的抗性分离情况及适合度测验¹⁾

Tah 2 Resistant segregation of the pursuit resistant rice and test for fitness

组合	世代	总苗数	成活苗数	死亡苗数	χ^2
1. 测 64/PT2	B ₂	43	43	0	
	B ₁	102	55	47	0.480 3
	F ₂	217	158	59	0.443 9
2 明恢 63/PT2	B ₂	62	62	0	
	B ₁	97	47	50	0.041 2
	F ₂	256	184	72	1.171 9
3 特青/PT2	B ₂	56	56	0	
	B ₁	113	54	59	0.141 6
	F ₂	298	220	78	0.161 1
4 02428/PT2	B ₂	54	54	0	
	B ₁	101	53	48	0.158 4
	F ₂	192	146	46	0.062 5

1) B₂= F₁ / P₁, B₁= F₁ / P₂, $\chi^2_{1,0.05}=3.84$

表 3 抗 pursuit 水稻反交组合的抗性分离的假设测验¹⁾

Tah 3 A hypothesis test of the resistant segregation of pursuit-resistant anti-backcross rice

组合	总苗数	成活苗数	死亡苗数	χ^2
PT2 // 测 64/PT2	48	48	0	
测 64 // 测 64/PT2	87	41	46	0.183 9
PT2 // 特青/PT2	44	44	0	
特青 // 特青/PT2	68	38	30	0.720 6

1) $\chi^2_{1,0.05}=3.84$

面的试验结果已证实 PT2 的抗性遗传表现为单显性遗传模式。本研究试图通过常规育种将这对抗性基因转移到我国优良恢复系里, 培育出同型抗性恢复系, 进而选配出能在生产上利用的抗性杂交组合。这一技术可行性已在抗除草剂 (Liberty) 杂交稻的选育上得到证实。将 PT2 作为父本与非抗性恢复系杂交, 然后以恢复系为回交亲本, 回交 2 代后, 再自交 2 代, 选取株型和穗型等农艺性状与原恢复系接近的单株同不育系珍汕 97A 和培矮 64S 测交, 测交组合的农艺性状考种结果见表 4。

可以看出, 除了珍汕 97A 测 64—P 株高高于珍汕 97A 测 64, 明恢 63—P 较明恢 63 的生育期明显缩短以及 02428—P 较 02428 的千粒重显著增加外, 抗性恢复系与所配组合的株高、生育期、每株穗数、每穗实粒数、结实率和千粒质量与相应的原恢复系和所配组合比较无明显差异。总体看来, 同型恢复系与所配组合的综合产量性状基本上接近原品种和杂交组合。

表 4 几个抗除草剂恢复系和杂交组合主要农艺性状比较¹⁾

Tah 4 Agronomic characters of several herbicide-resistant restoring lines and their hybrids

恢复系和杂交组合	株高/cm	全生育期/d	每株穗数	每穗实粒数	结实率/%	千粒质量/g
测 64 (控制组)	76.7	105	10.0	62.2	68.2	21.5
测 64-P	80.1	102	9.2	63.4	65.3	21.0
<i>t</i> 值	1.66	-1.24	-0.49	0.20	-0.26	-0.53
明恢 63 (控制组)	93.7	116	6.7	84.3	79.5	26.0
明恢 63-P	95.1	112	7.2	82.6	74.5	25.8
<i>t</i> 值	0.33	-2.86**	0.40	-0.11	-0.28	-0.14
特青 (控制组)	99.3	114	5.7	110.8	76.2	24.2
特青-P	97.6	111	6.4	105.4	73.2	23.8
<i>t</i> 值	-1.81	-1.73	1.48	-0.92	-0.03	-1.76
02428 (控制组)	72.3	98	5.3	105.6	87.0	23.7
02428-P	74.5	97	6.2	101.6	87.2	24.2
<i>t</i> 值	1.33	-1.14	1.81	-0.80	0.01	2.71**
珍汕 97A/测 64 (控制组)	78.7	101	11.3	73.2	77.3	23.9
珍汕 97A/测 64-P	82.6	99	10.8	75.6	75.8	24.1
<i>t</i> 值	3.29**	-1.42	-0.13	0.50	-0.25	-0.48
珍汕 97A/明恢 63 (控制组)	99.2	111	9.0	88.6	90.1	26.2
珍汕 97A/明恢 63-P	101.2	109	8.6	91.2	88.4	25.8
<i>t</i> 值	1.39	-1.42	-0.14	0.28	-1.09	-0.33
培矮 64S/特青 (控制组)	98.0	108	7.5	111.7	72.2	25.1
培矮 64S/特青-P	98.3	108	7.6	109.2	68.4	25.9
<i>t</i> 值	0.42	0	0.24	0.28	-1.32	0.65
培矮 64S/02428 (控制组)	95.7	100	7.7	99.7	76.1	22.7
培矮 64S/02428-P	99.5	101	8.5	100.3	78.9	21.6
<i>t</i> 值	1.15	0.71	0.47	0.06	1.05	-1.13

1) 测 64-P 表示抗 pursuit 的测 64, 其它类推。 $t_{0.05, 18} = 2.101$, $t_{0.01, 18} = 2.878$

3 讨 论

美国抗除草剂 (pursuit) 品种 PT2 的抗性遗传由单个显性基因控制, 因此通过常规杂交手段, 可将其抗性基因转育到我国优良恢复系中。经杂交后, 先回交 2 代, 再自交 2 代, 已经初步选育出 4 个同型抗性恢复系测 64-P、明恢 63-P、特青-P 和 02428-P。总体看来, 大多抗性恢复系和所配杂交组合主要农艺性状同原品种比较接近。但是个别组合的株高、生育期和千粒重与对应原品种和组合比较, 存在显著差异。这是否由抗性基因的负效应引起或由抗性基因所在染色体上其它基因, 拟或由同型抗性恢复系中美国品种其它染色体片段 (基因) 引起, 还有待进一步研究。当然, 应继续对这几个同型抗性恢复系进行回交转育, 通过边回交边测交的方法来选育优良单株。经过多代选择, 有望得到稳定的抗性恢复系。此外, 可以利用 02428-P 等带有广亲和血缘的抗性恢复系, 同化学杀雄的籼稻或粳稻品种杂交, 有望利用亚种间杂种优势培育出超级杂交稻。

抗除草剂 pursuit 恢复系选育成功后, 在苗期喷一定浓度的 pursuit 能有效地解决杂交稻制种中的纯度问题, 为农业生产提供超净杂交种。美国及中国通过生物技术已将抗除草剂 (草丁膦) 的 bar 基因整合到水稻品种, 由于采用基因枪介导法, 获得的转基因植株有单拷贝和多拷贝, 杂交 F2 代抗性植株分离比例 3:1 或 15:1。华南植物研究所利用美国阿肯色大学水稻研究中心提供的转 bar 基因水稻品种, 如 Culmfont 及 Bengal-Hu10 进行遗传分析。证明这两个品种的抗性是受一对显性基因控制, 及转入的 bar 基因是单拷贝^[3]。美国早在 1996 年就开展抗除草剂转 bar 基因水稻的大田试验, 充分表明抗除草剂的特性^[7]。种植抗除草剂转 bar 基因水稻有利于稻田化学除草, 特别是清除美国稻田中像杂草一样影响水稻产量和品质的红稻。水稻虽然是严格的自花授粉植物, 但仍然有 1% 的天然异交率, 长期种植转 bar 基因水稻有可能将 bar 基因转移到红稻或其它禾本科杂草中去, 给化学除草带来困难。因此, 开展通过组培诱导的办法, 选育抗除草剂水稻新品系, 以解决种植转 bar 基因水稻可

能带来的生态风险。若连续几年喷施同一种除草剂, 有可能加剧该类型除草剂抗性杂草出现的频率; 同时抗性杂交稻本身很可能成为下一茬水稻或其它农作物的新杂草。采用抗 *pursuit* 杂交稻组合和抗草丁膦杂交水稻轮作, 可望解决上述问题。

抗 *pursuit* 水稻在喷施 *pursuit* 药剂后, 要 3 周左右假杂种才能完全枯死。这对农业生产会产生一定程度的负面影响。因此要进一步对喷药时期、*pursuit* 使用浓度以及表面活性剂的使用剂量进行摸索, 找出能快速杀死假杂种且不伤害抗性材料的合适药剂配方和喷药时期。

参考文献:

[1] 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 1—5.
[2] 章善庆, 童汉华, 薛锐, 等. 利用 *bar* 基因导入恢复系提高杂交水稻纯度的尝试[J]. 中国农业科学, 1998, 31 (6): 33—37.

[3] 黎垣庆, 刘刚, 严文贵, 等. 转 *bar* 基因水稻除草剂抗性遗传研究与应用[J]. 杂交水稻, 2000, 15 (1): 40—43.
[4] MUHITCH M J, SHANER D L, STIDHAM M A. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants: properties of the enzyme from maize suspension culture cells and evidence for the binding of imazethapyr to acetohydroxyacid synthase *in vivo*[J]. Plant Physiol, 1987, 83: 451—456.
[5] SWANSON E B, HERRGESELL M J, ARNOLDO M, et al. Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones[J]. Theor Appl Genet, 1989, 78: 525—530.
[6] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物品种的现状与展望[J]. 世界农业, 1998, 8: 21—23.
[7] CRAVOIS K A, MOLDENHAUER K A K, BALDWIN F L, et al. Evalution of liberty — resistant rice in Arkansas // NORMAN R J, JOHNSTON T H, eds. Rice research studies. Fayetteville, Arkansas agricultural experiment station[M]. Arkansas: University of Arkansas, 1997: 12—16.

Genetic Analysis and Its Application of Rice PT2 Resistant to the Broad Spectrum Herbicide Pursuit

DUAN Fa ping, LI Yuan qing, DUAN Jun, FAN Shu guo, BAI Cheng ke, LIANG Cheng ye
(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Four rice restoring lines (Ce64, Minghui63, Teqing and 02428 as female parents) were crossed with herbicide pursuit resistant PT2 (as the male parent). Genetic analysis indicated that a single dominant nuclear gene controlled the resistance to herbicide pursuit. Four pursuit resistant restoring lines (Ce64 P, Minghui63 P, Teqing P and 02428 P) have been approximately developed by transferring the herbicide resistant gene into restoring lines via crossing and backcrossing. After crossing them with male sterile lines, four combinations, Zhenshan 97A /Ce64 P, Zhenshan 97A /Minghui63 P, Peiai64S /Teqing P and Peiai64S /02428 P have been bred. The newly developed herbicide resistant combinations could maintain the yield level of their corresponding original combinations. By spraying herbicide pursuit in seedling bed, non true hybrid plants can be eliminated completely. Using this technology, the purity problem during seed production in three line, two line or chemical emasculated hybrid rice breeding system could be solved and some new combinations could be bred. The prospects and problems of application this technology were discussed.

Key words: herbicide; pursuit; rice; inheritance; application