

江 群, 凌溪铁, 唐兆成, 等. EMS 诱变创制水稻抗乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂种质[ J ]. 江苏农业学报, 2023, 39( 2 ): 305-312.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.001

## EMS 诱变创制水稻抗乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂种质

江 群<sup>1</sup>, 凌溪铁<sup>2</sup>, 唐兆成<sup>2</sup>, 周珍珍<sup>2</sup>, 张保龙<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学热带作物学院/三亚南繁研究院, 海南 海口 570228; 2. 江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 创制非转基因抗除草剂水稻种质资源对于稻田杂草防控具有重要价值。本研究以甲基磺酸乙酯(EMS)水溶液诱变镇糯 19 水稻种子, 获得 1 株能稳定遗传的可耐受乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACCase*)抑制剂类除草剂高效盖草能的 M<sub>3</sub>代水稻幼苗(突变体)。分别扩增镇糯 19 野生型和突变体的基因组 DNA 并进行测序和序列比对, 发现突变体 *ACCase* 基因的开放阅读框(ORF)的第 5 374 位碱基发生了点突变, 导致编码的第 1 792 位氨基酸由异亮氨酸突变为亮氨酸。镇糯 19 野生型和突变体分蘖盛期大田喷施 3 种田间推荐剂量的 *ACCase* 抑制剂类除草剂后农艺性状调查结果表明突变体对高效盖草能、精喹禾灵和唑啉草酯抗性明显高于野生型。本研究获得了能稳定遗传的非转基因抗 *ACCase* 抑制剂类水稻新种质, 具有一定的应用价值, 为抗除草剂水稻育种提供了种质资源。

**关键词:** 水稻; 抗除草剂种质; 甲基磺酸乙酯(EMS); 乙酰辅酶 A 羧化酶

**中图分类号:** S335.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)02-0305-08

## EMS mutagenesis to create rice anti-acetyl-CoA carboxylase inhibitor-herbicide germplasm

JIANG Qun<sup>1</sup>, LING Xi-tie<sup>2</sup>, TANG Zhao-cheng<sup>2</sup>, ZHOU Zhen-zhen<sup>2</sup>, ZHANG Bao-long<sup>1,2</sup>

(1. College of Tropical Crops/Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Germplasm Resources and Biotechnology/Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Cultivating non-transgenic herbicide-resistant rice germplasm resources is of great value for weed control in rice fields. In this study, Zhennuo 19 rice seeds were mutagenized by ethyl methyl sulfonate (EMS) solution, and a M<sub>3</sub> generation of rice seedlings with stable inheritance and tolerance to acetyl-CoA carboxylase (*ACCase*) inhibitor herbicides were obtained. The genomic DNAs of wild-type and the mutant were amplified and sequenced respectively. It was found that there was a point mutation at the 5 374<sup>th</sup> base of the open reading frame of the resistant rice *ACCase* gene, resulting in a mutation of the encoded 1 792<sup>th</sup> amino acid from isoleucine to leucine. Three kinds of *ACCase* inhibitor herbicides were sprayed in the field and the agronomic traits were analyzed. The results showed that the resistance of the mutant to haloxyfop-*R*-methyl, quizalofop-*P*-ethyl and pinoxaden was significantly higher than that of wild type. In this study, a new non-transgenic rice germplasm with *ACCase* inhibitor resistance

was obtained, which had certain application value and could provide germplasm resources for herbicide-resistant rice breeding.

**Key words:** rice; herbicide-resistant germplasm; ethyl methyl sulfonate (EMS); acetyl CoA carboxylase

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(21)2041 ]

作者简介: 江 群(1998-), 女, 四川宜宾人, 硕士研究生, 主要从事水稻抗除草剂育种研究。(E-mail) 1692579264@qq.com

通讯作者: 张保龙, (E-mail) zhbl2248@hotmail.com; 周珍珍, (E-mail) zhenzhenzhouj@163.com

水稻是中国三大粮食作物之一,培育高产稳产的优质水稻是解决粮食问题的关键。稻田杂草严重影响水稻的产量和品质,杂草导致中国稻谷每年亏损率超过 15%,部分地区甚至超过 50%<sup>[1]</sup>。化学除草是当今世界使用最多的稻田除草方法。然而,过度使用除草剂不仅会导致杂草对除草剂产生抗性,还会对作物产生药害、降低水稻产量和品质,严重时甚至造成水稻颗粒无收<sup>[2]</sup>。因此,培育抗除草剂的水稻品种可以经济有效地解决稻田的杂草防除问题。

乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACCCase*)是植物初级代谢中脂肪酸合成的关键酶之一,其主要功能是将乙酰辅酶 A 羧化为丙二酰辅酶 A。该反应是脂肪酸合成的第一步,也是限速的关键步骤<sup>[3]</sup>。脂肪酸不仅是功能物质甘油三酯的组成成分,还能转化为作为细胞膜组成成分的磷脂<sup>[4]</sup>。自 1958 年发现乙酰辅酶 A 羧化酶可作为除草剂的作用靶标后,针对该靶标已开发了三大类除草剂并商品化应用,分别是芳氧苯氧基丙酸酯类(APP)<sup>[5]</sup>、环己烯酮类(CHD)<sup>[6]</sup>和新苯基吡唑啉类(DEN)<sup>[7-8]</sup>。其中,APP 类除草剂包括高效氟吡甲氧灵(*Haloxypop-R-methyl*,又称高效盖草能)、精喹禾灵(*Quizalofop-P-ethyl*)、精恶唑禾草灵(*Fenoxaprop-P-ethyl*,又称骠马)、恶唑酰草胺(*Metamifop*)和氰氟草酯(*Cyhalofop-butyl*)等。CHD 类除草剂包括烯禾啶(*Sethoxydim*)、噻草酮(*Cycloxydim*)和环苯草酮(*Profoxydim*)等;DEN 类除草剂有唑啉草酯(*Pinoxaden*)。乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂主要被用于控制禾本科杂草,具有高效、低毒、对后茬作物安全等特点<sup>[9]</sup>。目前,水稻生产中登记并许可使用的乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂仅有氰氟草酯、恶唑酰草胺和环苯草酮,这极大限制了水稻生产中杂草的防治。因此培育抗乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂水稻,不仅可以拓宽稻田除草剂的选择和使用范围,还可有效控制稻田杂草的发生与危害。

化学诱变是培育和筛选抗性除草剂作物种质资源的重要方法。EMS 是非常有效且负面影响小的化学诱变剂,被广泛应用于构建优良性状的水稻突变体<sup>[10-12]</sup>。顾佳清等利用 EMS 处理粳稻品种中花 11,从诱变的水稻群体中筛选出高产的突变体,经过后代的纯化,得到了一个可以直接推广应用的抗除草剂水稻新品系申化一号<sup>[13]</sup>。陈忠明等通过 EMS 处理

籼稻 9311,筛选出了大粒的突变体 M316 和长穗突变体 9311eR<sup>[14-15]</sup>。本课题组用 EMS 诱变处理包括 9311 在内的多个水稻品种,成功筛选到多个抗咪唑啉酮类除草剂的突变体,进一步鉴定结果表明突变均发生在编码乙酰乳酸合成酶(*ALS*)靶标基因上<sup>[16]</sup>。

本研究通过 EMS 诱变糯稻品种镇糯 19 构建突变群体,用 APP 类除草剂高效盖草能去筛选诱变处理后的 M<sub>2</sub>代幼苗,获得能稳定遗传的抗性植株,并抗性植株的 *ACCCase* 基因位点突变、氨基酸序列变异进行鉴定,最后就 3 种不同 *ACCCase* 抑制剂类除草剂对获得的抗除草剂材料农艺性状影响进行分析,旨在为水稻抗除草剂育种提供依据和材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试水稻材料镇糯 19 由江苏丘陵地区镇江农业科学研究所提供。试验所用除草剂的种类及相关信息见表 1。

表 1 本试验所用除草剂

Table 1 Herbicides used in this study

名称	类别	来源	推荐田间 施用剂量 (g/hm <sup>2</sup> , a.i.)
高效盖草能	APP	江苏中旗科技股份有限公司	64.8
精喹禾灵	APP	天津中农立华农用化学品有限公司	60.0
唑啉草酯	DEN	瑞士先正达作物保护有限公司	45.0

生物试剂甲基磺酸乙酯(EMS)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,2×Rapid Taq Master Mix、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司,CTAB 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 1.2 镇糯 19 水稻种子的 EMS 诱变及抗 *ACCCase* 抑制剂类除草剂突变体的筛选

镇糯 19 种子(M<sub>1</sub>代)清水浸泡 2 h 后,用质量浓度 5.0 mg/ml 的 EMS 水溶液浸种处理 14 h,硫代硫酸钠中和 30 min 后,将种子捞出并用清水冲洗 5~6 遍。将诱变处理后的种子播种于大田,M<sub>1</sub>代植株成熟后,种子混收(M<sub>2</sub>代)作为突变群体库。从突变群体库中取 M<sub>2</sub>代种子播种于大棚苗床,待水稻幼苗长至 3~4 叶期时喷施 64.8 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 高效盖草

能,施药后 21 d 观察记录水稻表型并将正常生长的水稻苗移栽至钵钵内,单株收获种子得到突变体种子( $M_3$ 代), $M_3$ 代种子播种后得到  $M_3$ 代幼苗。

### 1.3 抗除草剂突变体 *ACC*Case 基因的 PCR 鉴定和碱基序列分析

从国家水稻数据中心数据库(<https://www.rice-data.cn/>)获得水稻 *ACC*Case 基因(*OsACC*, 序列号为 LOC\_Os05g22940)的碱基序列。根据 *OsACC* 基因的保守序列使用 SnapGene 6.0.2 软件进行特异性引物设计,共设计了 8 对引物,分别是 *OsACC*-F1 ~ *OsACC*-F8 和 *OsACC*-R1 ~ *OsACC*-R8 (表 2)。

表 2 本试验所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	PCR 产物长度(bp)
<i>OsACC</i> -F1	GTCAGATTTCACACATCTGGG	1 422
<i>OsACC</i> -R1	CAGGGGCACAAATAATGTACT	
<i>OsACC</i> -F2	AAAAAGCTGCGTGAAGTATGC	1 614
<i>OsACC</i> -R2	TCTCGACTGTGAAGTGCTGC	
<i>OsACC</i> -F3	CCCTATTGAAGACATCCTGATTG	1 597
<i>OsACC</i> -R3	AACAGAAATGGCATGATGGA	
<i>OsACC</i> -F4	CAAACGTAGACTACACAGTTGAC	1 641
<i>OsACC</i> -R4	TGTTTGGCACCATTATGAGAA	
<i>OsACC</i> -F5	TTGACAAGGTAACATCATGTCC	1 635
<i>OsACC</i> -R5	AAAAGGTCATTGAAAAATTCACG	
<i>OsACC</i> -F6	TCTATCCAAATCCTGCTGCC	1 631
<i>OsACC</i> -R6	AATGGCCAGTTCTAATTGCG	
<i>OsACC</i> -F7	AGTTTCTCTCGGGCCAGATT	1 634
<i>OsACC</i> -R7	GGCTGGTCAAGACGCTGTAT	
<i>OsACC</i> -F8	CATGGAAGTGCTGCTATTGCCAG	1 866
<i>OsACC</i> -R8	CAGACTTGCACTTTTCATCTGGCA	

采用 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取水稻的基因组 DNA,取  $M_3$ 代三叶一心期的叶片 0.5 g 放在带有 1 颗小钢珠的 2 ml 离心管中,放到液氮中冷冻至叶片组织变脆,再将离心管放到频率为 60 Hz 的组织研磨机研磨 2 min,然后加入 400  $\mu$ l CTAB 提取液,离心管 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后,在通风橱中加入 400  $\mu$ l 氯仿,充分混匀至提取液呈乳绿色,12 000 r/min 离心 10 min,在离心期间标记好管号,将 600  $\mu$ l 无水乙醇加入到已经标记好的 1.5 ml 离心管中,移液枪吸取上清液 300  $\mu$ l 加到已经准备好的离心管中,上下颠倒

混匀再沉淀 1 h 以上,12 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,开盖,室温下风干 12 h 至离心管底部有明显的白色 DNA 沉淀,风干后加入灭菌蒸馏水 200  $\mu$ l,于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

以  $M_3$ 代的基因组 DNA 为模板,采用 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 或 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 聚合酶扩增 *OsACC* 基因的 8 个片段。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。将条带大小正确的 PCR 产物送南京擎科生物科技有限公司进行测序;使用 SnapGene 6.0.2 软件分析测序结果,明确野生型和突变体的 *OsACC* 基因碱基序列差异性。

### 1.4 喷施除草剂后水稻农艺性状调查

2022 年在江苏省农业科学院试验基地进行镇糯 19 野生型和突变株系对 3 种乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂耐受性试验。5 月中旬播种,6 月中旬插秧。试验设分别喷施高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯及清水对照 4 个处理,每处理 2.5 m $\times$ 4.0 m。移栽行距为 0.25 m,株距为 0.15 m。按照常规大田生产进行浇水和施肥等田间管理。

镇糯 19 野生型和突变体幼苗移栽大田 27 d 后,进行高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯及清水(CK)的喷施处理。除草剂的用量见表 1。各处理选择连续的 20 株,在水稻喷施除草剂前以及喷施除草剂后 30 d、90 d 进行茎蘖数、株高、主茎旗叶长度等农艺性状调查。其中,喷药后 90 d,水稻已进入成熟期,统计的茎蘖数为成穗数。

### 1.5 数据处理与统计分析

采用 Microsoft Excel 2019 进行数据处理,用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗除草剂突变体筛选

高效盖草能是一种内吸传导型除草剂,EMS 诱变的镇糯 19  $M_2$ 代水稻幼苗在 3~4 叶期喷施高效盖草能 7 d 后,绝大部分水稻幼苗叶片颜色变成浅绿;喷施高效盖草能 21 d 后,敏感植株叶片几乎完全失去绿色、部分已经枯死;具有抗性的植株能继续正常生长。经大量筛选后,最终获得 1 株具有高效盖草能抗性的  $M_2$ 单株(图 1),成熟后收获单株种子,得到  $M_3$ 代抗性突变体。

### 2.2 *OsACC* 突变位点

已知高效盖草能的作用靶标是 ACCase,植物对





图 1 喷施高效盖草能后筛选到的  $M_2$  代抗性水稻植株

Fig.1  $M_2$  generation resistant rice plant screened after spraying with 64.8 g a.i./hm<sup>2</sup> haloxyfop-*R*-methyl

高效盖草能的抗性主要源于 *ACC*ase 基因的突变<sup>[17-19]</sup>。为了确定突变体中靶标基因是否发生突变,我们用了 8 对引物对野生型(镇糯 19-WT)和抗性  $M_3$  单株(镇糯 19-1792)的基因进行扩增,全部都获得了与预期大小相符合的条带(图 2)。

上述 PCR 扩增的产物经测序和碱基序列比对,发现相对于野生型 *OsACC* 的 ORF,突变体 *OsACC* 基因中存在一个点突变,其开放阅读框(ORF)的第 5 374 位碱基由 A 突变成 T,从而引起编码的第 1 792 位氨基酸由异亮氨酸(Ile)突变为亮氨酸(Leu)(图 3A)。*OsACC* 蛋白的全长有 2 327 个氨基酸,将 *OsACC* 蛋白全长氨基酸序列在 NCBI 的 Conserved Domain 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守结构域分析,发现其包含了 4 个结构域(Domain):生物素羧化酶(BC)、生物素羧基载体蛋白(BCCP)、乙酰辅酶 A 羧化酶中心(*ACC* central)和羧基转移酶(CT)(图 3B)。进一步的氨基酸序列分析结果表明,突变体中第 1 792 位氨基酸的突变位于 CT 结构域,该突变类型与已报道的大穗看麦娘(*Alopecurus myosuroides*)的抗性位点突变类型是一致的,对应于其 *ACC*ase 氨基酸序列第 1 781 位点;突变类型也相同,均由 Ile 突变为 Leu(图 3B 和 3C)<sup>[17]</sup>。因此,突变体抗除草剂功能的获得是由 *OsACC* 氨基酸序列第 1 792 位氨基酸由异亮氨酸突变为亮氨酸引起的。

### 2.3 突变体的农艺性状

在分别喷施高效盖草能、精喹禾灵和唑啉草酯 14 d 后,野生型植株生长均受到了显著影响,大部

分植株叶片出现枯黄症状。突变体植株在分别喷施以上 3 种除草剂后,叶片仍然是绿色且可以正常生长,表明突变体对这 3 种除草剂均具有抗性(图 4)。

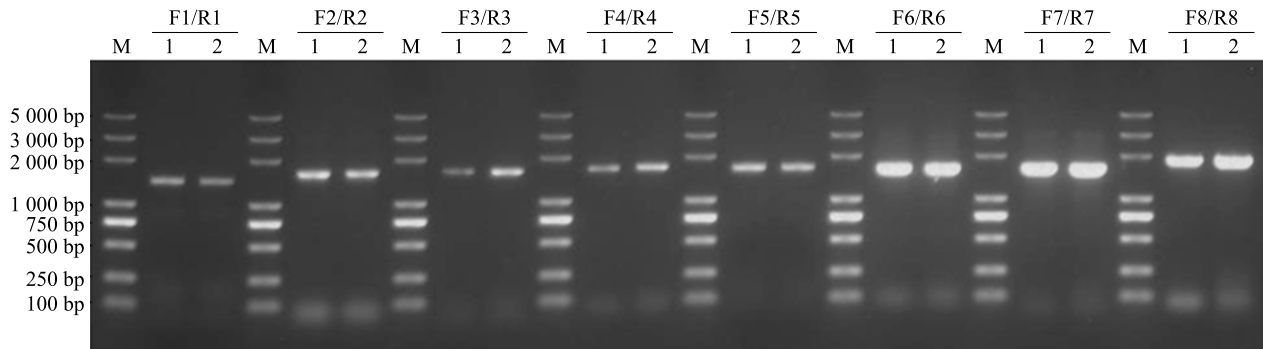
分蘖期分别喷施 3 种不同除草剂后,野生型和突变体株高、分蘖数及旗叶长度的变化如图 5 所示。结果显示,在喷施清水处理的情况下,野生型和突变体植株的株高在处理前(0 d,即幼苗移栽到大田 27 d)基本没有差异,但在处理后 30 d 和 90 d,突变体的株高显著低于野生型的株高(图 5A);两者在处理前、后的单株茎蘖数均无明显差异(图 5E)。在分别喷施 3 种不同除草剂前(0 d),野生型和突变体植株的株高和单株分蘖数都没有明显差异,但是在喷施处理后,两者受除草剂的影响表现出明显差异(图 5B~图 5D、图 5F~图 5H)。其中,在喷施高效盖草能 30 d 和 90 d 后,突变体的株高均显著高于野生型(图 5B),单株茎蘖数也显著多于野生型(图 5F)。野生型对精喹禾灵和唑啉草酯都非常敏感,喷施田间推荐剂量后水稻植株均死亡,因此未统计喷药后的株高和分蘖数,而突变体对这两种除草剂表现出较强的抗性,所有植株存活且能正常生长,株高随时间逐渐增加(图 5C 和 5D)。突变体的单株茎蘖数在精喹禾灵处理后随时间呈先增后减趋势,但经唑啉草酯处理后变化不明显,未出现明显增加现象(图 5G 和 5H)。

喷施清水处理的突变体旗叶长度显著短于野生型;高效盖草能处理后,突变体的旗叶长度显著长于野生型(图 5I)。由于野生型在喷施田间推荐剂量的精喹禾灵和唑啉草酯后植株已经枯死,因此未能进行旗叶长度统计。

综合以上结果,在田间推荐剂量下,突变体对高效盖草能、精喹禾灵和唑啉草酯的抗性水平均高于野生型。

## 3 讨论

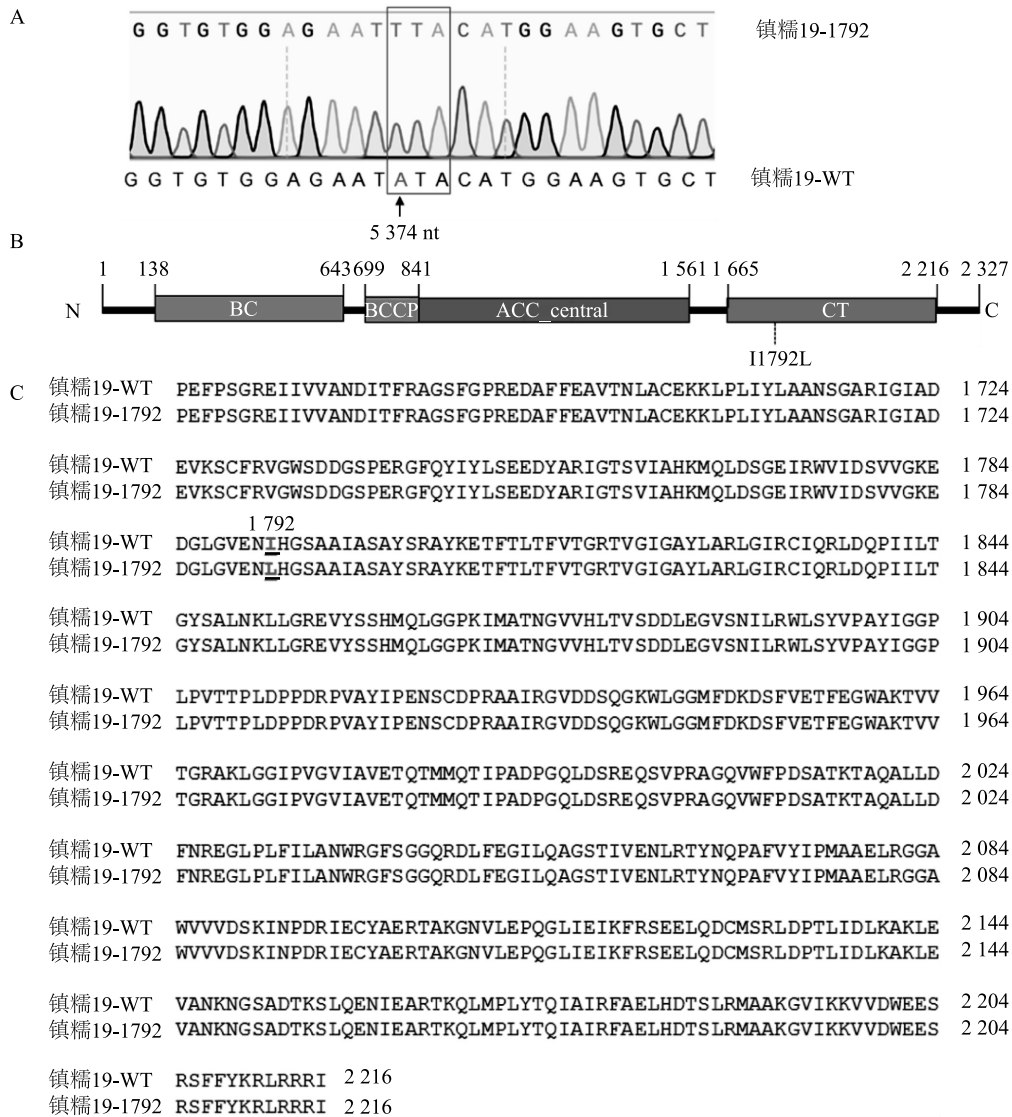
植物对除草剂的抗性机制包括非靶标和靶标抗性两大类。其中,非靶标抗性是由靶标基因以外的突变引起的,使植物对除草剂的吸收或转运率降低、螯合或代谢作用增强;靶标抗性是由除草剂的靶标基因发生突变引起的<sup>[20]</sup>。现在已发现的大部分植物抗 *ACC*ase 抑制剂类除草剂的抗性机制是由于 *ACC*ase 基因碱基突变引起氨基酸位点发生变异,这也是导致杂草抗药性产生的主要原因<sup>[21-22]</sup>。截止



M 表示 DNA marker;泳道 1 表示野生型;泳道 2 表示突变体。F1~F8、R1~R8 为引物,见表 2。

图 2 镇糯 19 野生型和突变体中 *OsACC* 基因的 PCR 扩增结果

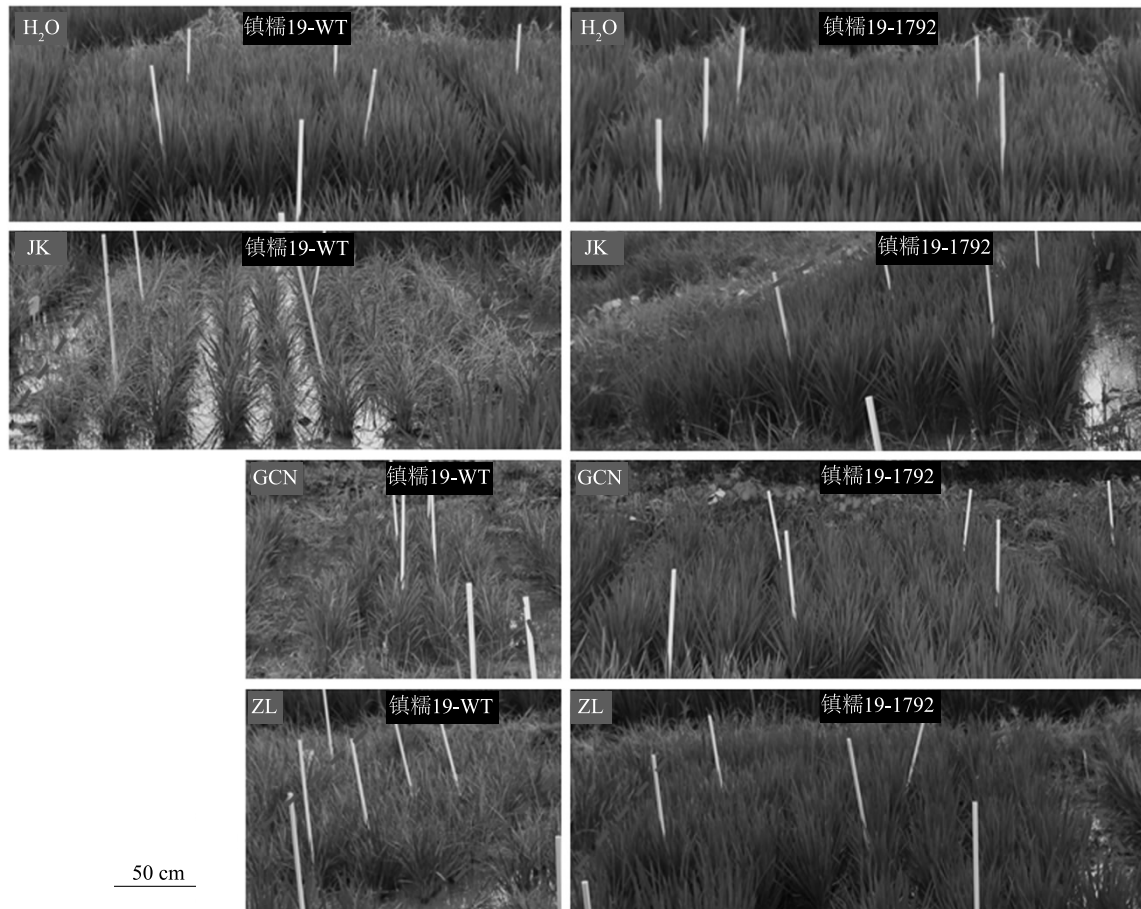
Fig.2 PCR amplification of *OsACC* in Zhennuo 19 wild-type and mutant



A:突变体(镇糯 19-1792)中 *OsACC* 基因的 Sanger 测序色谱图;B:*OsACC* 蛋白结构域示意图;C:野生型(镇糯 19-WT)和突变体(镇糯 19-1792)的羧基转移酶(CT)结构域氨基酸序列比对。

图 3 镇糯 19 突变体中突变基因 *OsACC* 及其编码氨基酸序列分析

Fig.3 Analysis of mutant gene *OsACC* and its encoded amino acid sequence in Zhennuo 19 mutant



镇糯 19-WT、镇糯 19-1792 分别表示镇糯 19 野生型和突变体;GCN、JK、ZL 和  $H_2O$  分别表示喷施高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯及清水处理。

图 4 镇糯 19 野生型和突变体田间喷施不同除草剂后的表型

Fig.4 Phenotypes of Zhennuo 19 wild-type and mutant after spraying with different herbicides in the field

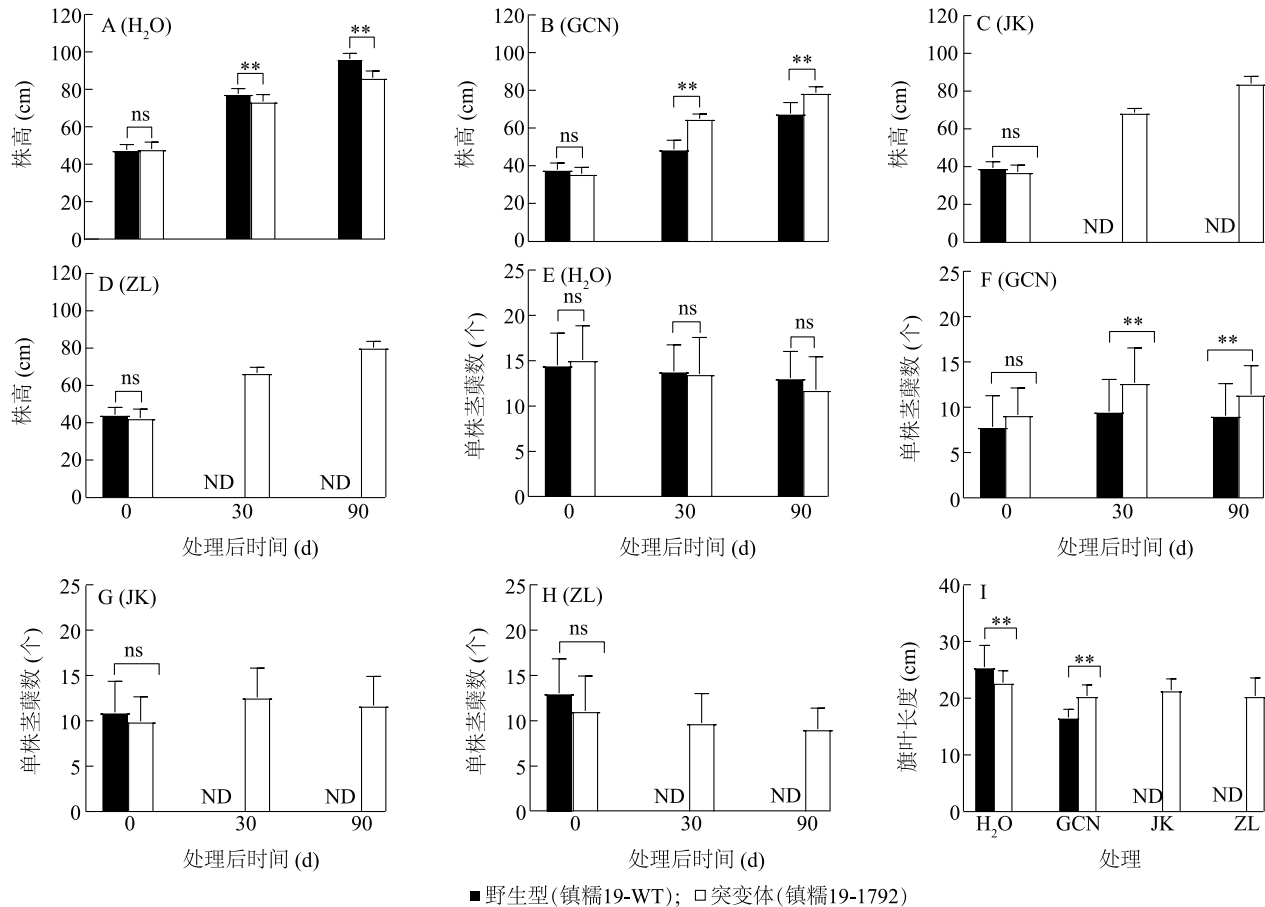
目前,杂草中已报道了十几种 *ACC*ase 氨基酸置换与其抗药性相关,分别对应于大穗看麦娘 *ACC*ase 的 7 个氨基酸位点(均位于 CT 结构域内):第 1 781 位、第 1 999 位、第 2 027 位、第 2 041 位、第 2 078 位、第 2 088 位和第 2 096 位<sup>[22-25]</sup>。在以上这些突变中,以第 1 781 位氨基酸由 Leu 突变成 Ile 最为普遍,对三大类不同的 *ACC*ase 抑制剂类除草剂都表现出高抗性,却没有适合度代价(Fitness cost)<sup>[26-28]</sup>。本研究通过筛选 EMS 诱变的镇糯 19 水稻突变体,鉴定到了 1 个能稳定遗传的抗除草剂突变体。对突变体进行了基因鉴定,确定其编码靶标蛋白 OsACC 的第 1 792 位氨基酸由 Leu 突变成 Ile。该突变类型与已报道的突变类型一致,对应于大穗看麦娘 *ACC*ase 第 1 781 位氨基酸突变。这是该突变类型使水稻获得多种 *ACC*ase 抑制剂类除草剂抗性的首次报道。

EMS 是最常见的化学诱变剂,在植物的诱变育

种中被广泛应用<sup>[29]</sup>。本试验通过 EMS 诱变镇糯 19 种子,筛选到了抗 *ACC*ase 抑制剂类除草剂的水稻植株,突变体能耐受田间推荐剂量的高效盖草能、精喹禾灵和唑啉草酯。其中,喷施了田间推荐剂量的唑啉草酯后,镇糯 19 野生型植株在处理 30 d 后几乎全部死亡;喷施了田间推荐剂量的精喹禾灵后,野生型的植株在喷施 30 d 后全部死亡;而突变体在分别喷施 3 种除草剂后,均未出现死亡现象,基本可以正常生长。所获得的抗性突变体对高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯的抗性水平均明显强于野生型。突变体和野生型的最小致死剂量或 50% 抑制浓度( $GR_{50}$ )、OsACC 酶活性的差异尚有待进一步明确。

大豆、棉花和玉米等转基因作物已在全球范围内进行了商品化生产,产生了巨大的社会效益和经济效益。目前为止,中国虽然有多种转基因作物已经被正式批准商品化生产,但进行大面积种植的仅





■野生型(镇糯19-WT); □突变体(镇糯19-1792)  
H<sub>2</sub>O、GCN、JK、ZL 分别表示喷施清水、高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯处理; \* 表示在 0.05 水平上显著, \*\* 表示在 0.01 水平上极显著。  
ND 表示没有数据, ns 表示没有显著差异。

图 5 不同除草剂处理下的水稻株高、分蘖数和旗叶长度

Fig.5 Plant height, tiller number and flag leaf length of rice under different herbicide treatments

有番木瓜和棉花。2009 年,农业部颁发了中国拥有自主知识产权的转 *Bt* 基因抗虫水稻生产应用安全证书,但目前中国尚未批准转基因水稻的商业化生产。因此,培育非转基因的抗除草剂水稻品种具有重要价值。上世纪 90 年代晚期,美国路易斯安那州立大学稻米研究中心通过 EMS 诱变技术育成了一系列耐咪唑啉酮类除草剂(*ALS* 抑制剂类除草剂)的非转基因水稻品种。2002 年,巴斯夫公司开发了非转基因抗咪唑啉酮类除草剂的水稻品种 Clearfield 在美国进行了商业化推广,解决了水稻种植的杂草稻危害问题<sup>[30]</sup>。2018 年,巴斯夫又在美国上市了非转基因水稻品种 Provisia,可以抗精喹禾灵,拟与抗咪唑啉酮类除草剂水稻品种 Clearfield 进行轮作并交替使用两种不同作用机理的除草剂,实现对杂草稻和其他一年生杂草的可持续性防控<sup>[31]</sup>。本研究通过 EMS 诱变筛选到的抗 *ACC*ase 抑制剂类

除草剂突变体,具有与抗除草剂精喹禾灵水稻品种 Provisia 类似的抗除草剂性状,可为中国非转基因抗除草剂水稻育种提供重要材料。

## 4 结 论

本研究通过 EMS 诱变筛选获得了可稳定遗传的抗 *ACC*ase 抑制剂类除草剂的水稻突变体材料,可耐受 3 种不同田间推荐剂量的除草剂,具有一定的生产应用价值。野生型在喷施田间推荐剂量的高效盖草能、精喹禾灵、唑啉草酯后,株高和分蘖均受到严重抑制甚至死亡,但突变体基本能正常生长。突变体中 *OsACC* 突变基因编码蛋白质的第 1792 位氨基酸由 Ile 变成 Leu,使其对 *ACC*ase 抑制剂类除草剂的耐受性显著提高。在当前中国转基因水稻尚未放开、公众对转基因作物品种存在疑虑的大背景下,本研究获得的非转基因抗除草剂材料具有良好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] 董立尧,高原,房加鹏,等.我国水稻田杂草抗药性研究进展[J].植物保护,2018,44(5):69-76.
- [2] 程艳勤.浅析除草剂对水稻的危害及治理[J].农技服务,2016,33(6):109-114.
- [3] KONISHI T K U J, SHINOHARA K, YAMADA K, et al. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme[J]. Plant and Cell Physiology, 1996, 37(2): 117-122.
- [4] 王爽,张荣全,叶非.乙酰辅酶A羧化酶抑制剂的研究进展[J].农药科学与管理,2003(10):26-32.
- [5] 蔡靖萱.扬州市小麦田菵草对ACCCase抑制剂的抗性研究[D].扬州:扬州大学,2020.
- [6] RENDINA A R, FELTS J M. Cyclohexanedione Herbicides are selective and potent inhibitors of acetyl-CoA carboxylase from grasses[J]. Plant Physiol, 1988, 86(4): 983-986.
- [7] 袁国徽,王恒智,赵宁,等.耿氏硬草对乙酰辅酶A羧化酶类除草剂抗性水平及分子机制初探[J].农药学报,2016,18(3):304-310.
- [8] 董元海.新苯基吡唑啉类除草剂唑啉草酯的合成[D].武汉:武汉大学,2017.
- [9] 刘博宏,叶非.芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂的应用进展[J].农药科学与管理,2011,32(2):20-25.
- [10] 吕军,刘军,姜秀英,等.EMS诱导水稻‘辽星1号’突变体的筛选与鉴定[J].分子植物育种,2022,20(12):4038-4043.
- [11] 董颖苹,连勇,何庆才,等.植物化学诱变技术在育种中的运用及进展Ⅱ.突变体的筛选及分子检测[J].种子,2005,24(8):54-58.
- [12] 黄静.水稻EMS诱变效率和品种内遗传多态性分析[D].福州:福建农林大学,2015.
- [13] 顾佳清,张智奇,周音,等.EMS诱导水稻中花11突变体的筛选和鉴定[J].上海农业学报,2005,21(1):7-11.
- [14] 陈忠明,王秀娥.水稻强优势恢复系9311粒重的诱变改良[J].分子植物育种,2005,3(3):353-356.
- [15] 陈忠明,王秀娥,胡兴雨,等.水稻长穗颈恢复系9311eR的诱变选育[J].江苏农业科学,2005(4):9-11.
- [16] 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.
- [17] DÉLYE C, CALMÈS É, MATÉJICEK A. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6): 1114-1120.
- [18] DÉLYE C, ZHANG X, CHALOPIN C, et al. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypionate but not to cyclohexanedione inhibitors[J]. Plant Physiology, 2003, 132(3): 1716-1723.
- [19] DÉLYE C, ZHANG X, MICHEL S, et al. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass[J]. Plant Physiology, 2005, 137(3): 794-806.
- [20] POWLES S B, YU Q. Evolution in Action: plants resistant to herbicides[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 317-347.
- [21] 袁国徽,田志慧,高原,等.上海市水稻田千金子对3种乙酰辅酶A羧化酶抑制剂的抗性现状及酶突变机制[J].农药学报,2022,24(3):492-500.
- [22] BECKIE H J, TARDIF F J. Herbicide cross resistance in weeds[J]. Crop Protection, 2012, 35: 15-28.
- [23] DENG W, CAI J, ZHANG J, et al. Molecular basis of resistance to ACCase-inhibiting herbicide cyhalofop-butyl in Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis* (L.) Nees) from China[J]. Pestic Biochem Physiol, 2019, 158: 143-148.
- [24] PENG Y, PAN L, LIU D, et al. Confirmation and characterization of cyhalofop-butyl-resistant Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis*) populations from China[J]. Weed Science, 2020, 68(3): 253-259.
- [25] 张怡,陈丽萍,徐笔奇,等.浙江稻区千金子对氟氯草酯和噁唑酰草胺的抗药性及其分子机制研究[J].农药学报,2020,22(3):447-453.
- [26] VILA AIUB M M, NEVE P, POWLES S B. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population[J]. New Phytologist, 2005, 167(3): 787-796.
- [27] MENCHARI Y, CHAUVEL B, DARMENCY H, et al. Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*[J]. Journal of Applied Ecology, 2008, 45(3): 939-947.
- [28] WANG T, PICARD J C, TIAN X, et al. A herbicide-resistant ACCase 1781 setaria mutant shows higher fitness than wild type[J]. Heredity (Edinb), 2010, 105(4): 394-400.
- [29] SERRAT X, ESTEBAN R, GUIBOUT N, et al. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations[J]. Plant Methods, 2014, 10(1): 5.
- [30] SHA X Y, LINScombe S D, GROTH D E. Field evaluation of imidazolinone-tolerant Clearfield rice (*Oryza sativa* L.) at nine Louisiana locations[J]. Crop Science, 2007, 47(3): 1177-1185.
- [31] CAMACHO J R, LINScombe S D, SANABRIA Y, et al. Inheritance of Provisia rice resistance to quizalofop-p-ethyl under laboratory and greenhouse environments[J]. Euphytica, 2019, 215(4): 83.

(责任编辑:石春林)