

旱稻×稗草远缘杂交研究

赵凤梧¹, 李慧敏¹, 赵 明², 刘冬成³, 王志敏², 赵秀琴², 刘 勇³

(1. 河北省农林科学院旱作农业研究所, 河北 衡水 053000; 2. 中国农业大学, 北京 100094;
3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 以旱稻基因型早 65 为母本, 稗草长芒稗为父本, 通过杂交、回交技术, 导入稗草高光效、速生长基因, 效果非常明显。

关键词: 旱稻; 长芒稗; 远缘杂交; 回交; 杂种优势

中图分类号: S5.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0076-05

Studies on Distant Hybridization of Upland Rice (*O. sativa*) × Barnyard Grass(*E. caudata*)

ZHAO Feng-wu¹, LI Hui-min¹, ZHAO Ming², LIU Dong-cheng³,
WANG Zhi-min², ZHAO Xiu-qin², LIU Yong³

(1. Dry Land Farming Institute, Heibei Academy of Agriculture and Forestry Sciences,
Hengshui 053000, China; 2. Chinese Agricultural University, Beijing, 100094, China; 3. Institute
of Genetics and Developmental Biology, CAS, Beijing 100101, China)

Abstract: 7 years successive studies on the progenies derived from cross and backcross (BC) between upland rice (*O. sativa*) genotype Han 65 and long-awn barnyard grass (*E. caudata*) were carried out. The results showed that distant hybridization was an effective way for transferring the gene(s) of higher growth rate (HGR) and of higher photosynthetic rate (HPR).

Key words: Upland rice; Long-awn barnyard grass; Distant hybridization; Backcross; Heterosis

水资源紧张与高营养需求对稻米市场提出严重挑战。旱稻 (Upland rice) 作为一种新兴粮作, 已显示出极大的优越性^[1]。为进一步提高稻类的抗逆性及增产潜力, 遗传育种工作者利用远缘杂交及转基因技术, 通过引入 (导入) 外源基因, 培育超高产种质, 取得重大研究进展^[2, 3]。C₄ 植物由于具有 CO₂ 浓缩机制, 能在高光强、高温及低 CO₂ 浓度、干旱缺水条件下有较高的光合效率和营养、水分利用率, 同时与 C₄ 光合有关的酶在对生物和非生物逆境 (如机械创伤、低温、盐害及紫外线辐射) 的防御反应中也具有较重要的作用, 是理想的远缘杂交亲本^[4]。稻类属于 C₃ 植物, 在现在的大气 O₂ 浓度 (21%) 下, 由于与光合作用相伴随的光呼吸, 使光合速率与无氧

情况下相比, 降低了 30%~40%^[5]。因此自 60 年代发现 C₄ 光合途径后, 将 C₄ 高光合性状导入 C₃ 作物以提高作物光合效率, 成为重要的研究领域^[5]。特别是进入 90 年代后, 随着转基因技术的发展, 通过农杆菌介导系统, 成功地将玉米光合途径的关键酶磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPC) 及丙酮酸磷酸二激酶 (PPDK) 导入水稻, 获得了高表达的转基因植株。转 PEPC 基因水稻系表现出较高的光合能力^[4], 为实现 C₄、C₃ 植物间遗传物质交流、提高光合作用及超高产育种, 开辟了一条新途径, 提供了理论依据。C₄ 植物长芒稗 (*Echinochloa caudata*), 是半

收稿日期: 2003-07-02

基金项目: 河北省自然科学基金 (302452) 资助项目

作者简介: 赵凤梧 (1958-) 男, 河北枣强人, 副研究员, 主要从事作物遗传育种研究工作。

干旱地区一年生优势杂草^[6]。具有喜温耐旱, 抗逆性强, 生长繁茂, 竞争优势大, 根系发达, 光合速率高等特点, 含有培育旱稻超高产种质有利的目的基因, 用其作父本, 与目前生产上大面积示范的品种陆稻基因型“旱稻 65”, 进行了远缘杂交及回交, 取得一些进展, 已获得遗传学、分子生物学、生理学依据, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验时间及地点

本试验于 1996~2002 年衡水旱作所试验田进行。

1.2 试验方法、材料

1.2.1 亲本 母本基因型旱稻 65, 中国农业大学提供。父本选自本所试验田田间孳生杂草长芒稗。

1.2.2 试验药品及仪器 除草剂为旱稻专用除草剂 2 号(中国农业大学提供)、神除(二氯喹啉酸)(江苏省昆山市化工厂生产)。喷施时间为苗期及五叶期。光合速率测定仪“BAU 光合测定系统”, 由中国农业大学制造。测定时期为开花期的旗叶, 时间为 9:00~12:00, 14:00~17:00。光合速率计算单位为 $\text{CO}_2\text{mg}\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 。分子生物学鉴定即 AFLP 技术检测分析, 在中国科学院遗传与发育生物学研究所完成。

1.3 田间种植及取样

$F_1\sim F_3$ 点播, 行距 30 cm, 株距 10 cm, 1999 年 6 月 10 日播种, 2000 年 6 月 16 日播种, 2001 年 5 月 29 日播种。BC₁ 及母本种于花盆, 花盆直径 30 cm, 高 50 cm。土壤过筛, 按每亩 50 kg 二铵, 20 kg 尿素, 500 kg 鸡粪, 500 kg 骡马粪, 进行配土、调匀。每盆装土 14 kg。定量容器浇水, 全生育期各项管理一致。每盆种植母本及后代各 1 株, 重复 2 次; 跟踪测量记载主茎各叶片出现时间、叶面积及生育期。收获及考种按全国旱稻区试同一方案进行。

1.4 统计方法

SASTM平方根数据转换变量分析程序及 Table-CurveTM曲线拟合程序。

2 结果与分析

2.1 杂交 F_1 表现

杂种 F_1 表现较强的杂种优势, 植株生长健壮、穗大粒多, 表现顶芒。各性状及考种结果见表 1。由表 1 看出, F_1 除了株穗数无优势外, 在株高、冠高、穗长、一级枝梗数、穗总粒数、穗实粒数、结实率、

千粒重诸性状, 均存在正向杂种优势。其超亲优势分别为 34.30%, 28.39%, 37.10%, 45.45%, 60.07%, 60.46%, 5.20%, 4.72%。尤其是单株产量, 超亲达 80.39%, 是一个难得的杂交种。

2.2 F_2 分离世代

F_2 在株高、穗长、芒性等农艺性状上呈现严重分离, 但育性并无分离, 群体 405 株无不育株出现。根据育种目标, 选到远杂单株 F_{2-1} 。该单株呈现父本基部茎节裸露、长芒的特性, 杂种优势仍十分明显。对其株高、冠高、穗长、一级枝梗数、穗总粒数、穗实粒数、结实率、千粒重及单株产量诸性状考种结果见表 1。由表 1 看出, F_{2-1} 单株在上述性状, 其超亲优势分别为 38.27%, 31.14%, 39.18%, 48.39%, 44.98%, 45.96%, 1.44%, 6.20% 及 49.39%。成熟期较母本提早 5 d。

2.3 F_3 田间表现

F_3 除在芒性、育性等性状上无分离外, 在其他性状上继续分离。对群体 106 株株穗数、株高、主茎穗穗长、主茎穗一级枝梗数、主茎穗总粒数、主茎穗结实粒数及主茎穗结实率进行室内考种, 求其平均数并与母本 20 株平均结果进行比较, F_3 上述诸性状平均超亲优势分别为 2.32%, 15.18%, 47.27%, 33.83%, 24.26%, 21.62%, -2.13%。SASTM T-test 进行检验, 同母本相比, 株穗数与结实率两性状差异不显著; 株高差异达 0.05 显著水平; 主茎穗穗长、一级枝梗数、穗总粒数、穗结实粒数的差异均达 0.01 显著水平(表 1)。

2.4 抗除草剂试验

1999, 2000 及 2001 年均在两叶一心期用旱稻专用除草剂 2 号对 F_1 , F_2 及 F_3 进行处理, 每亩 250 mL 兑水 50 kg 喷洒。为进一步鉴定杂交后代对除草剂的抗性, 在幼苗三叶一心期又用神除每亩 30 g, 兑水 50 kg 再次进行处理, 均未发现药物反应, 表明杂交后代抗除草剂, 未导入非抗除草剂基因。

2.5 落粒性

通过对 F_1 , F_2 405 株及 F_3 160 株观察, 尚无发现父本长芒稗自然落粒野生现象, 表明未导入该不良基因。

2.6 光合速率测定

在开花期, 随机选取正在开花的父本、母本及 F_3 植株旗叶进行光合速率测定, 与 C_3 作物棉花、 C_4 作物玉米、高粱、谷子等主要农作物进行比较(表 2)。由表 2 看出, 不同的科、属参试作物之间, 光合速率差异较大, 其趋势为 C_4 作物光合速率均大于

C₃ 作物。其中,稗草光合速率为 58.8 CO₂mg°dm⁻²·h⁻¹,居于首位,早稻最低。依次为长芒稗>高粱>玉米>谷子>远 F₂-1>棉花>早稻。用 SASTM平方根数据转换变量分析程序进行显著性测定结果,长芒稗同所有参试作物间的差异,均达到显著水平,说明是一个非常理想的高光合速率父本。高粱、玉米、谷子光合速率虽然高于其他 C₄ 作物,但不及长芒稗,方差分析达到显著水平。早稻基因型早 65、秦爱光合速率虽有差异,但方差分析结果差

异不显著,属于同一水平;稻稗远缘杂交后代远 F₂-1 光合速率为 35.2 CO₂mg°dm⁻²·h⁻¹,比父本 C₄ 植物长芒稗低 35.07%,高于母本 C₃ 作物早稻 65 29.71%,介于双亲之间。方差分析结果,均达到 0.05 的显著水平,说明光合速率同母本相比已经发生质的变化,远缘杂交非常有效。

2.7 分子生物学鉴定

用 AFLP 技术检测,在 20 个 BamH I/Mse I 的酶切组合中,鉴定出来自稗草的 450 bp 左右的片段。

表 1 早稻×长芒稗远缘杂交后代性状表现

	株穗数	株高	冠高	穗长	芒性	一级枝梗	穗粒数	穗实粒数	结实率	千粒重	单株产量
	(个)	(cm)	(cm)	(cm)		(个)	(个)	(个)	(%)	(g)	(g)±母本(%)
F ₁	4	90.25	73.92	21.25	顶芒	12.00	117.25	108.75	91.49	26.60	12.05
母本 ♀	4	67.20	57.58	15.50	无芒	8.25	73.25	65.75	86.96	25.40	6.68
±母本±♀(%)		34.30	28.39	37.10		45.45	60.07	60.46	5.20	4.72	80.39
F ₂ -1	4	86.25	70.98	20.25	长芒	11.50	112.0	104.0	92.86	27.40	10.98
母本 ♀	4	62.38	54.12	14.55	无芒	7.75	77.25	71.25	91.54	25.80	7.35
±母本±♀(%)		38.27	31.14	39.18	48.39	44.98	45.96	1.44	6.20		49.39
F ₃	3.53	109.94		22.65	长芒	14.12	144.89	129.57	89.43		
母本 ♀	3.45	95.45		15.38	无芒	10.55	116.60	106.54	91.38		
±母本±♀(%)	2.32	15.18		47.27		33.83	24.26	21.62	-2.13		
T-test	不显著	0.05		0.01		0.01	0.01	0.01	不显著		

表 2 不同作物光合速率测定结果

作物名称	长芒稗	高粱	玉米	谷子	远 F ₂ -1	棉花	早 65	秦爱
XI±S	58.8±6.4	51.4±8.0	46.4±7.7	42.8±6.9	35.2±7.6	31.0±5.9	27.12±6.6	23.7±4.1
F ₂ -1±%	-35.07	-31.60	-24.18	-17.80		13.48	29.71	32.63
方差分析 LSD	A	B	B C	C	D	D E	E F	F

表 3 BC₁ 各叶片出现时间

名称	一叶	二叶	三叶	四叶	五叶	六叶	七叶	八叶	九叶	十叶	平均	温度(℃)	
	天数	天数	天数	天数	天数	天数	天数	天数	天数	天数	天数	总积温	平均
重复 I ♀	4	10	16	24	30	38	46	52	58	65	6.5	1 711.3	171.13
BC ₁	3	8	13	18	24	30	37	42	48	53	5.3	1 420.9	142.09
重复 II ♀	4	11	16	23	29	38	45	50	57	64	6.4	1 761.1	176.11
BC ₁	3	9	14	19	24	30	36	42	49	54	5.4	1 504.1	150.41
平均 ♀	4	10.5	16	23.5	29.5	38	45.5	51.5	57.5	64.5	6.45	1 736.2	173.62
BC ₁	3	8.5	13.5	18.5	24	30	36.5	42	48.5	53.5	5.35	1 462.5	146.25
BC ₁ ±♀	1	2	2.5	5	5.5	8	9	9.5	9.5	9	1.1	273.7	27.37

2.8 回交后代表现

通过对母本(早稻/稗草)F₃, BC₁(下同)种植在同一花盆, BC₁ 生长势表现强大的优势,抽穗期早于母本 9 d。主要表现为叶片出现时期早、发育快。但主茎叶片变小变窄,叶面积呈现-45.41%负优势。对主茎叶片发生规律进行观察发现:

2.8.1 叶片出现时间 母本及回交后代叶片发生数量相同,均为 10 片叶。但回交后代叶片出现时间早于母本,并一直保持领先优势,表现出强大的杂种优势。自第一片叶开始至旗叶,分别早于母本 1, 2, 2.5, 5, 5.5, 8, 9.5, 9.5 及 9 d, 第 8 片叶,达到最大值(表 3)。

2.8.2 叶片发育速度 植株生长期间,母本主茎全部叶片需要 64.5 d 完成发育,每片叶由出现至完全展开,平均需要 6.45 d。BC₁ 主茎全部叶片需要

53.5 d 完成发育,每片叶由出现至完全展开,平均需要 5.35 d,二者相差 1.1 d(表 3)。SASTM 方差分析结果,二者差异达 0.01 极显著水平(表 5)。

表 4 母本及 BC₁ 叶面积比较

名称		一叶		二叶		三叶		四叶		五叶		六叶		七叶		八叶		九叶		十叶		总和		(Σ)平均	
		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽		长 宽	
		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)		(cm)	
重复 I	♀	5.0	0.4	12.0	0.4	14.5	0.4	16.1	0.6	21.3	0.7	25.8	1.0	36.7	0.9	40.2	1.0	43.5	1.2	53.2	1.4	268.3	8.0	26.83	0.80
	BC ₁	2.5	0.2	6.5	0.2	8.0	0.3	10.0	0.5	15.5	0.5	18.7	0.7	21.0	0.8	32.0	1.0	35.2	1.2	46.5	1.4	160.7	6.8	16.0	70.68
重复 II	♀	5.2	0.4	11.0	0.3	13.1	0.5	16.5	0.65	22.3	0.8	24.8	1.1	35.0	1.2	40.8	1.0	43.5	1.2	53.0	1.4	265.2	8.55	26.52	0.86
	BC ₁	3.5	0.3	7.5	0.2	8.0	0.4	13.0	0.5	17.5	0.5	18.2	0.7	24.5	0.8	32.5	0.9	36.5	0.9	44.5	1.2	205.7	6.4	20.57	0.64
平均	♀LA	2.55		5.06		7.72		12.74		20.47		33.18		46.89		50.63		65.25		92.93		1765.55		176.56	
	BC ₁ LA	0.97		1.75		3.50		7.19		10.31		16.14		22.75		38.28		46.93		74.06		963.70		96.37	
BC ₁ ±♀ (%)		-62.01		-65.43		-54.66		-43.59		-49.62		-51.34		-51.49		-24.38		-28.08		-20.30		-45.41		-45.41	

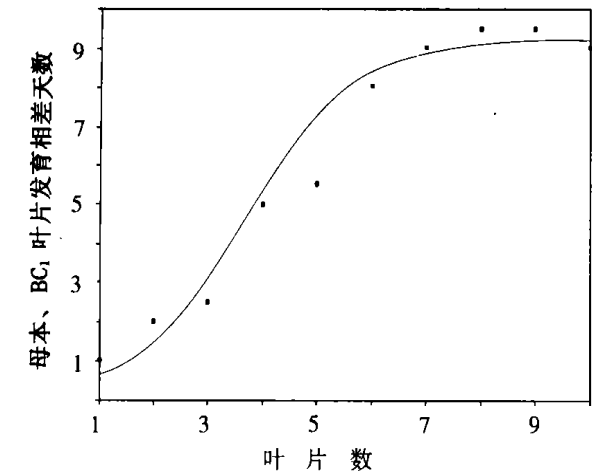


图 1 早稻、稗草回交 BC₁ 与母本叶片发育相关曲线

2.8.3 叶片发育所需要的积温 母本主茎全部叶片完成发育需要总积温为 1 736.2 °C, 平均每片叶发育需要积温 173.62 °C; BC₁ 主茎全部叶片完成发育需要总积温为 1 462.5 °C, 平均每片叶发育需要积温 146.25 °C; 每片叶发育所需积温相差 27.37 °C, 即 BC₁ 每片叶完成发育, 较母本少需要积温 27.37 °C(表 3)。SAS 方差分析结果, 二者差异达 0.05 显著水平(表 5)。

表 5 SASTM 变量分析结果

变量		发育速度(天/叶)	积温(°C/叶)	叶面积(cm ² /叶)
平均值	♀	6.45	173.62	176.56
	BC ₁	5.35	146.25	96.37
显著性	LSD	0.01	0.05	0.05

2.8.4 叶面积 各叶叶面积均低于母本, 自第一叶开始至旗叶, 各叶片叶面积同母本相比, 分别降低 -62.01%, -65.43%, -54.66%, -43.59%,

-49.62%, -51.34%, -51.49%, -24.38%, -28.08%及 -20.30%, 平均降低 -45.41%(表 4)。SASTM 方差分析结果, 差异达 0.05 显著水平(表 5)。

2.8.5 方程拟合 用 TableCurveTM 对 BC₁、母本二者对应叶片发生时间差异及叶片数关系, 进行相关曲线拟合, 求得相关方程为 $y^{-1}=a+be^{-x}$, 相关系数为 $r^2=0.95$ 。其中, 截距 $a=0.11$, 斜率 $b=4.20$ 。具体相关方程为 $y^{-1}=0.11+11.43^{-x}$ (图 1)。

3 结论

远缘杂交是导入外源基因的有效途径, 已在多种作物取得成功。但从父母本遗传物质及杂交程度看, 有二种方式。一种是经典异源精卵杂交, 即父本整套染色体的导入, 但后代往往因亲本遗传物质不亲和而表现不育。另一种是父本片段遗传物质或部分遗传物质导入, 即基因导入^[3,7]。从本试验稻稗远缘杂交及回交后代表现结果看, 属于后者。一次杂交, 成功获得父本长芒稗高生长率, 长芒子、高光合速率及茎节裸露等性状, 光合速率较母本提高 29.71%, 并获得分子生物学依据。对改良早稻前期生长发育较慢, 同杂草田间竞争优势较弱, 提高光合速率及提高产量, 具有积极的意义。用原父本回交, BC₁ 生育期提前, 叶片发生早, 发育快, 叶面积变小, 回交效果十分明显。

有关抗旱性与植株相关农艺性状及表现研究较多, 不同学者从不同角度对其进行了深入探讨, 共性的研究结果认为: 较小的叶面积^[8,9], 叶片发生早、发育较快^[10,11], 较早的开花期^[12], 早熟性^[13] 是作物抗旱性的标志, 并将其作为抗旱育种田间选择指

标。本试验中, BC₁ 旗叶完成发育时间暨挑旗期, 早于母本 9 d。叶面积减小, 平均降低 45.41%。对改良旱稻生育期, 提高前期竞争优势, 奠定了遗传物质基础。应用远缘杂交、回交技术, 将稗草的抗逆性与高光合性能转入栽培旱稻, 创造出抗逆性强, 光合效率高, 丰产潜力大的优异种质, 将促进稻类遗传育种的长足进步。对该杂交组合后代进一步的相关研究, 正在进行之中。

致谢: 河北省农林科学院粮油作物研究所李香菊博士帮助完成杂交父本分类工作, 在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 王化琪. 旱稻—可持续发展的稻作[N]. 科学时报, 1999. 11. 21.
- [2] 黄群策. 同源四倍体水稻及狼尾草杂交的效果[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(1): 48—50.
- [3] 李太贵. 作物的三种种质资源[J]. 植物遗传资源科学, 2002, 3(3): 62—64.
- [4] Ku MSB, Kano M Y, Matsuoka M. Evolution and Expression of C4 Photosynthesis genes[J]. Plant physiol, 1996, 111: 949—957.
- [5] 黄雪清, 焦德茂. 转 C₄ 光合酶基因水稻株系的抗光氧化特性[J]. 植物生理学报, 2001, 27(5): 393—400.
- [6] 李杨汉. 中国杂草志[M]. 北京中国农业出版社, 1998. 1215.
- [7] 柴守玺, 王德四, 王丽芝. 黄土高原西部地区春小麦不同抗旱耐瘠生态类型的聚类分析[J]. 水土保持通报, 1989, 9(2): 35—39.
- [8] Singh S D, Yadav T P, Bhat J S. Breeding strategies for drought tolerance in maize[J]. Crop Improvement, 2000, 27(2): 167—177.
- [9] Hafid R, Smith D H, Karrou M, *et al.* Morphological attributes associated with early-season drought tolerance in spring durum wheat in a Mediterranean environment[J]. Euphytica, 1998, 101(3): 273—282.
- [10] Ku M S B, Sakae A, Mika N, *et al.* High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice [J]. Plants Nature Biotechnol, 1999, 17: 76—80.
- [11] Quarrie S A, Pekic S, Stojanovic J. Improving drought resistance in small-grained cereals: A case study, progress and prospects [J]. Plant Growth Regulation, 1999, 29(1—2): 1—21.
- [12] Rana V K, Sharma S C. Correlation among some morpho—physiological characters associated with drought tolerance in wheat[J]. Crop Improvement, 1997, 24(2): 194—198.
- [13] Deblonde P, Ledent J F. Effects of moderate drought conditions on crop growth parameters and earliness of six potato cultivars under field conditions [J]. Agronomie, 2000, 20(6): 595—608.