

水稻乙酰乳酸合酶 Ala179Val 突变赋予 ALS 抑制剂类除草剂广谱抗性

安 晨¹, 韶 也², 彭 彦², 毛毕刚^{1,2}, 赵炳然^{1,2}

(¹湖南大学生物学院隆平分院, 长沙 410125; ²湖南杂交水稻研究中心杂交水稻全国重点实验室, 长沙 410125)

摘要: 为了鉴定新型水稻突变体 *ALS*¹⁷⁹ 对乙酰乳酸合酶 (ALS, acetolactate synthase) 抑制剂类除草剂的抗性, 本研究以野生型水稻华航31 (HH31)、耐咪唑啉酮除草剂水稻 *ALS*⁶²⁷ 突变体和甲基磺酸乙酯 (EMS, ethyl methyl sulfone) 诱变的新颖水稻突变体 *ALS*¹⁷⁹ 为试验材料, 通过不同浓度下的 4 类乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂包衣浸种和苗期喷施处理, 进一步测定表型及相关酶活性指标来探究突变体 *ALS*¹⁷⁹ 的抗性。结果表明, 经过除草剂包衣浸种以及苗期喷施处理后, 突变体 *ALS*¹⁷⁹ 对苯磺隆、咪唑乙烟酸、双草醚及啶磺草胺具有不同程度的抗性, 且乙酰乳酸合酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性随除草剂浓度的升高呈下降趋势。除了 20×, 30× 的咪唑乙烟酸处理条件下过氧化氢酶和过氧化物酶的酶活性低于野生型 HH31 外, 其他处理条件下 *ALS*¹⁷⁹ 的乙酰乳酸合酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶的酶活性均高于野生型 HH31。因此, 本研究发现 Ala179Val 突变赋予了对 ALS 抑制剂类除草剂的广谱抗性, 为后续 ALS 类除草剂广谱抗性水稻品系的培育提供遗传种质资源。

关键词: 水稻; 乙酰乳酸合酶; ALS 抑制剂类除草剂; 广谱抗性

Ala179Val Mutation in Rice Acetolactate Synthase Confers Broad-spectrum Resistance to ALS Inhibitor Herbicides

AN Chen¹, SHAO Ye², PENG Yan², MAO Bigang^{1,2}, ZHAO Bingran^{1,2}

(¹Longping Branch, College of Biology, Hunan University, Changsha 410125; ²State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125)

Abstract: To characterize the resistance of the novel rice mutant *ALS*¹⁷⁹ to acetolactate synthase (ALS) inhibiting herbicides, this study analyzed the Ethyl Methyl Sulfone (EMS)-mutagenized novel rice mutant *ALS*¹⁷⁹, together with wild-type Huahang31 (HH31), imidazolinone-tolerant rice *ALS*⁶²⁷ mutant, treated by four types of ALS-inhibiting herbicides by either seed coating or seedling spray treatment at different concentrations. The phenotypes and enzyme activity indexes were further determined to investigate the resistance of the mutant *ALS*¹⁷⁹. The results showed that the mutant *ALS*¹⁷⁹ showed various degrees of resistance to benzensulfuron, imazethapyr, bispyribac-sodium and pyroxsulam after herbicide coating for seed soaking and seedling spraying, and the activities of acetolactate synthase, peroxidase, catalase and superoxide dismutase tended to decrease with increasing herbicide concentration. The enzyme activities of acetolactate synthase, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase were higher in *ALS*¹⁷⁹ than in wild-type HH31 under all treatment conditions, except for imidazoleisonicotinic acid treatment condition at high concentration where the enzyme activities of catalase and peroxidase were lower than those of wild-type HH31. Collectively, we found that the Ala179Val mutation conferred broad-spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides and provided genetic germplasm resources for

收稿日期: 2023-06-28 修回日期: 2023-07-31 网络出版日期: 2023-09-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230628004>

第一作者研究方向为植物遗传学与品种培育, E-mail: chen_an99@163.com; 韶也作为共同第一作者

通信作者: 赵炳然, 研究方向为植物遗传学与品种培育, E-mail: brzhao652@hhrac.cn

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-01-14)

Foundation project: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-01-14)

the subsequent breeding of ALS-inhibiting herbicide broad-spectrum resistant rice lines.

Key words: rice; acetolactate synthase; ALS-inhibiting herbicides; broad-spectrum tolerance

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界范围内最重要的粮食作物之一,而田间杂草是全球粮食生产的一大重要威胁,影响水稻正常生长发育进而导致产量损失^[1]。随着中国劳动力成本的增加,劳动力从农村流向城市,中国的水稻种植方式逐渐从密集细致的移栽转变为轻简栽培^[2],包括直播种植,使得田间杂草的问题变得越来越严重^[3-4]。因此,人们开发了多种化学除草剂来应对这种问题。然而,化学除草有着严格的管控,需要在不损害作物的情况下选择性杀死杂草。如若操作不当,就会产生药害,导致作物减产甚至植株死亡^[5]。培育具有抗化学除草剂的水稻是解决该问题的一种有效途径^[6]。此外,通过用除草剂包衣种子的方法可以有效地防除杂草并杀除自交不育系等种苗,在不伤害农作物的同时保障两系杂交稻种子的纯度^[7-8]。

目前,研究人员主要通过转基因、基因编辑、突变体筛选等方法获得除草剂抗性水稻^[9-11]。例如,将编码丝菌素乙酰转移酶(PAT, phosphinothricin acetyl transferase)的吸湿链霉菌基因*pat*转化进水稻创制的草甘膦抗性水稻Liberty Link^[12],以及通过替换5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)的内源基因*OsEPSPS*(C519T + C528T)获得的草甘膦抗性水稻突变体*TIPS*^[13]。前人还通过理化诱变方法获得了一些除草剂抗性水稻,如对原卟啉原IX氧化酶(PPX, protoporphyrinogen oxidase)抑制剂除草剂的抗性水稻OE2和OE15^[14]、抗咪唑啉酮类除草剂水稻Clearfield®(CL121和CL141)^[15]、对乙酰辅酶a羧化酶(ACCCase)抑制剂精喹禾灵具有抗性的水稻Provisia™(PV)^[16-17]以及邓兴旺团队利用EMS诱变培育出的具有多种优良性状的抗除草剂水稻品种洁田稻001^[18]。此外,日本科学家在天然水稻资源中发现一种新的水稻基因*HIS1*可以赋予水稻对4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)除草剂的抗性^[19]。

乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)是植物合成支链氨基酸(如缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)的关键酶,也是植物支链氨基酸生物合成第一步的催化酶^[20]。乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂也称ALS类除草剂,其主要通过抑制ALS活性,干

扰ALS编码蛋白与底物结合来阻止植物支链氨基酸的生物合成,从而达到灭杀杂草的目的^[17]。ALS类除草剂具有活性高、选择性强、生物安全性高等特点,按照不同的结构可以将其划分为5大类,分别是磺酰脲类(SU, sulfonylureas)、咪唑啉酮类(IMI, imidazolinone)、三唑嘧啶磺酰胺类(TP, triazolopyrimidines)、嘧啶水杨酸类(PTB, pyrimidinylthio-benzoates)和磺酰氨基羰基三唑啉酮类(SCT, sulfonylamino-carbonyl-triazolinones)^[21]。截至目前,已在栽培稻、野生稻和杂草稻中发现一系列具有ALS抗性的突变位点,主要包含Ala-96、Ala-122、Pro-197、Ala-205、Asp-376、Trp-548、Trp-574、Ser-627、Gly-628、Ser-653和Gly-654等位点的氨基酸突变。上述大部分位点突变主要分布于ALS蛋白的高度保守结构域内,可以对多种ALS类除草剂产生抗性^[22-25]。美国利用Ser-627培育的抗咪唑啉酮类除草剂水稻在多个国家进行了商业化种植^[26],但咪唑啉酮类除草剂(如咪唑乙烟酸)在土壤残留较长。因此,发掘对ALS类除草剂具有广谱抗性的水稻,对未来用于大田生产或者通过包衣实现种子保纯具有重要意义。

前期通过EMS诱变获得了两种抗咪唑啉酮类除草剂的水稻突变体*ALS*¹⁷⁹和*ALS*⁶²⁷,其中*ALS*⁶²⁷是目前已知抗性突变位点(Ser-627)抗咪唑啉酮类除草剂的突变体,而*ALS*¹⁷⁹是一个新的突变位点,其第179位氨基酸由Ala突变为Val(Ala179Val)。本研究在对*ALS*¹⁷⁹进行分子特征鉴定的基础上,进一步通过除草剂包衣浸种鉴定、苗期喷施试验以及相关酶活性检测,分析突变体*ALS*¹⁷⁹对ALS不同化学家族中代表性除草剂的抗性,以为ALS类除草剂广谱抗性水稻的培育提供新的遗传种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methyl sulfone)诱变华航31(HH31,由华南农业大学提供)获得的耐咪唑啉酮类除草剂抗性水稻突变体*ALS*⁶²⁷和*ALS*¹⁷⁹,以及野生型HH31。

1.2 *ALS*¹⁷⁹KASP分子标记的共分离验证

2021年春在湖南杂交水稻研究中心三亚海棠

湾南繁基地以抗咪唑啉酮类除草剂水稻 *ALS*¹⁷⁹ 作父本, 以野生型 HH31 作母本进行杂交, 获得 F₁; 2021 年夏在湖南杂交水稻研究中心长沙金鼎山试验基地种植 F₁, 收获 F₂ 种子; F₂ 种子在实验室利用 96 孔板水培, 幼苗长至两叶一心期, 用咪唑啉酮类除草剂喷施处理, 分别编号取嫩叶, 提取 DNA, 放入 -20 °C 冰箱保存。

参考水稻基因数据库 (<https://www.ricedata.cn/gene/>) 中 *ALS* 的序列数据, 在第 536 位碱基处 (C-T) 设计 KASP 分型引物, 包括两个特异性正向引物 F1-FAM 和 F2-HEX, 以及一个通用反向引物 179-Reverse。序列信息详见表 1。KASP PCR 反应体系

(10 μL): 2× Taq Parms PCR Mix 5 μL, DNA 提取液 1 μL, F1-FAM (10 μmol/L) 0.15 μL, F2-HEX (10 μmol/L) 0.15 μL, 179-Reverse (10 μmol/L) 0.4 μL, 加 ddH₂O 补至 10 μL。阴性对照以等量 ddH₂O 代替 DNA 提取液。设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

KASP 标记的 PCR 反应共需 4 个阶段, 第 1 阶段 95 °C 变性持续 10 min; 第 2 阶段 95 °C 持续变性 15 s, 61 °C 退火 60 s, 共 10 个循环 (每次循环降低 0.6 °C); 第 3 阶段 95 °C 扩增 15 s, 55 °C 退火 60 s, 共 28 个循环; 第 4 阶段 30 °C 读板 30 s。KASP 反应使用 Applied Biosystems QuantStudio7 进行。

表 1 *ALS* 基因 KASP 标记引物序列
Table 1 *ALS* gene KASP marker primer sequences

引物名称 Primer	KASP 引物序列 (5'-3') KASP primer sequences (5'-3')	携带位点 Carrier site
F1-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTATGGGCGTCTCCTGGAAGG	C
F2-HEX	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTATGGGCGTCTCCTGGAAGA	T
179-Reverse	CGCATGATCGGCACCGAC	

1.3 不同种类 ALS 除草剂模拟包衣浸种试验

挑取籽粒度饱满的 HH31、*ALS*¹⁷⁹ 和 *ALS*⁶²⁷ 种子, 浸没在含有 2% 的次氯酸钠溶液中消毒 30 min, 冲洗干净后滤出。按照除草剂推荐浓度 (1×) 配置好 5 个梯度 (1×、5×、10×、20×、30×) 包衣除草剂, 在包衣除草剂溶液下浸种 48 h, 使药剂完全渗透进水稻种子中, 滤出, 对照组正常清水浸种 48 h。之后放置在 37 °C 恒温培养箱中催芽过夜, 在 96 孔播种板上进行

播种, 每种水稻播种 3 列, 各 24 粒, 水稻之间留 1~2 列间隙。所有种子均在营养液下水培。待水稻培养约 10 d 后进行拍照, 对根系长度、植株高度等数据进行统计处理, 3 次生物学重复。所用水培溶液采用国际水稻所水稻营养液试剂盒配制。因预实验发现 *ALS*¹⁷⁹ 对氟唑磺隆除草剂不具有抗性, 故使用其他 4 种 ALS 类除草剂进行后续试验。包衣除草剂溶液种类及推荐浓度配置详见表 2。

表 2 ALS 类代表性除草剂包衣/喷施浓度及稻田土壤消解半衰期
Table 2 Representative herbicide coating/spraying concentration of ALS class and degradation half-life of paddy soil

除草剂类别 Herbicide category	除草剂 Herbicide	除草剂包衣/喷施浓度 (1×) Herbicide coating/spraying concentration (1×)	土壤消解半衰期 (d) Half-life of soil digestion	参考文献 Reference
磺酰脲类 SU	10% 苯磺隆 (可湿性粉剂)	17.50 mg/L	8.61~10.34	[27]
咪唑啉酮类 IMI	苄草净 (5% 咪唑乙烟酸水剂)	0.60 mL/L	25.66~133.29	[28]
嘧啶水杨酸类 PTB	双草醚 (灵跃® 15% 悬浮剂)	0.50 mL/L	1.6~4.3	[29]
磺酰氨基三唑啉酮类 SCT	氟唑磺隆 (10% 可分散油悬浮剂)	0.14 mL/L	2.5~4.4	[30]
三唑嘧啶磺酰胺类 TP	啶磺草胺 (优先® 4% 可分散油悬浮剂)	0.60 mL/L 本 (4% 啶磺草胺)+0.80 mL/L 助 (聚醚改性的七甲基三硅氧烷)	2~13	[31]

SU: Sulfonylureas; IMI: Imidazolinone; PTB: Pyrimidinylthio-benzoates; SCT: Sulfonylamino-carbonyl-triazolinones; TP: Triazolopyrimidines; The same as below

1.4 4种ALS类除草剂苗期喷施试验

将消毒后的水稻种子浸种48 h后催芽。挑选发芽状况良好的水稻种子播种在96孔播种板中,做好标记,放置在1 L的黑色水培盒中置于宁波东南仪器有限公司生产的人工气候箱中培养,培养条件:光照条件下,温度28℃,时间14 h,相对湿度70%,光照强度43000 lx;黑暗条件下,温度26℃,时间8 h,相对湿度65%。将HH31, *ALS*¹⁷⁹, *ALS*⁶²⁷培养至两叶一心期(约15 d),利用苯磺隆、咪唑乙烟酸、双草醚、啶磺草胺对水稻进行梯度喷施处理,对照组均匀喷施清水,处理组均匀喷施相同体积、不同处理浓度的除草剂溶液,总计喷施一次,喷施浓度为大田推荐浓度下的1×、5×、10×、20×、30×。在处理后的第0 d、15 d、25 d时进行拍照。所用除草剂喷施具体浓度及其土壤消解半衰期详见表2。

1.5 不同除草剂不同浓度下酶活性的测定

采用整株测定法测量水稻的各项酶活性指标^[32]。选取经不同ALS类除草剂处理的HH31和*ALS*¹⁷⁹在处理后的24 h进行乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)、超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)的活性测定,3次生物学重复。

1.6 数据收集与分析

利用Microsoft 2019进行数据收集与整理;统计分析软件IBM®SPSS®Statistics 26.0进行单因素(ANOVA)方差分析及Waller Duncan检验进行多重比较;Graphpad Prism 8软件进行分析作图。分析所得柱状图为所示数据的平均值,所得的标准差用误差线表示。

2 结果与分析

2.1 *ALS*¹⁷⁹突变体抗性共分离验证

根据*ALS*¹⁷⁹变异位点设计KASP分子标记,并用于杂交F₂群体的基因型分析,结果显示,群体植株的抗性基因型可以清晰地分成3类(图1)。靠近横坐标位置的蓝色信号仅检测到FAM信号,为野生型基因型CC,表现为除草剂敏感;靠近纵坐标的绿色信号仅检测到HEX信号,为纯合抗性植株基因型TT,中间位置红色信号表示同时检测到FAM和HEX信号,为杂合抗性基因型CT,TT型与CT型均表现为除草剂抗性,表型统计结果符合孟德尔遗传定律3:1分离比。因此,该标记可以有效地区分*ALS*¹⁷⁹群体F₂植株的抗性基因型。

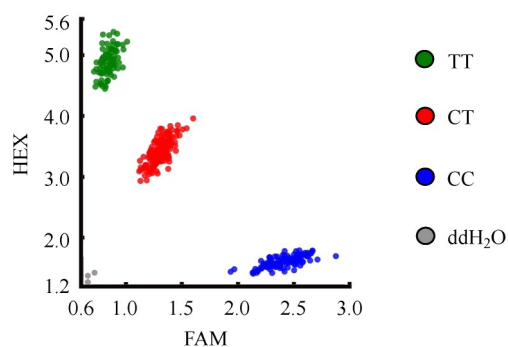


图1 KASP标记鉴定F₂代分离群体
Fig.1 KASP marker identification of F₂ generation segregating populations

表3 *ALS*¹⁷⁹突变体抗性共分离表型统计

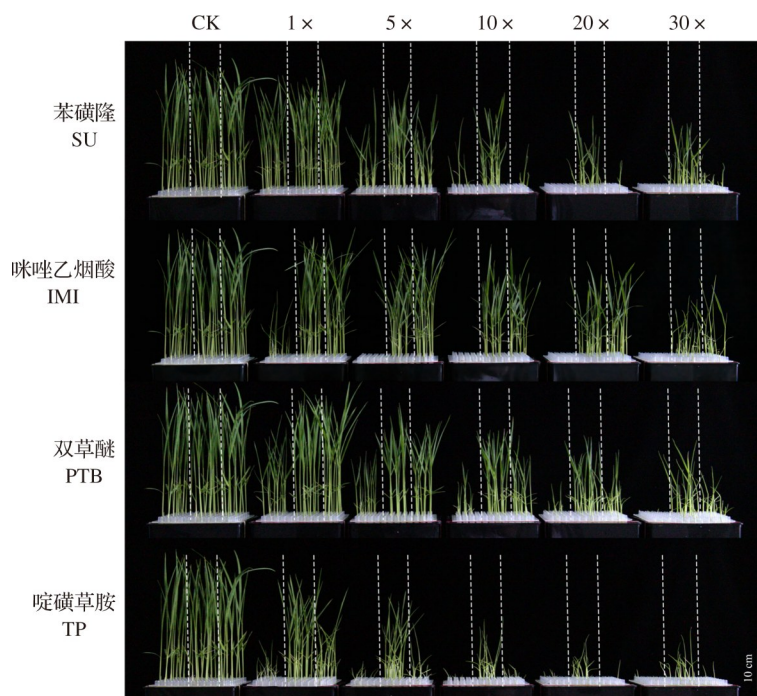
Table 3 Phenotypic statistics of *ALS*¹⁷⁹ mutant resistance co-segregation

基因型 Genotypes	表型 Phenotypes	植株数量 Number of plants
CC	敏感	131
CT	抗	247
TT	抗	122

2.2 利用ALS类除草剂模拟除草剂包衣种子研究

2.2.1 4种ALS类除草剂模拟除草剂包衣梯度的研究

本研究首先利用5种ALS类除草剂进行除草剂模拟包衣浸种试验,结果显示*ALS*¹⁷⁹对氟唑磺隆不具有抗性,对其他4种除草剂具有一定的抗性。因此,为探究*ALS*¹⁷⁹的抗性水平,本研究利用除氟唑磺隆外的4种ALS类除草剂进行模拟除草剂包衣梯度浸种。当培养10 d后,*ALS*¹⁷⁹在浸种后均可正常萌发生长,而HH31的生长受到了明显抑制甚至死亡。比对*ALS*¹⁷⁹在4种除草剂的植株长势发现,*ALS*¹⁷⁹对苯磺隆、咪唑乙烟酸、双草醚的抗性明显强于啶磺草胺。在4种除草剂处理下对*ALS*¹⁷⁹和*ALS*⁶²⁷进行比较,发现在10×苯磺隆、10×双草醚以及5×啶磺草胺处理下*ALS*¹⁷⁹幼苗还可保持一定的植株长势,但*ALS*⁶²⁷却生长受阻或不再发芽。在咪唑乙烟酸梯度处理下*ALS*¹⁷⁹的幼苗长势与*ALS*⁶²⁷虽大体一致,但在30×浓度处理下稍弱于*ALS*⁶²⁷。这表明两种抗性突变材料都能在4种除草剂处理下生长,但随着处理浓度的升高,植株长势都会受到不同程度的抑制但均明显强于野生型HH31。且*ALS*¹⁷⁹的受抑制程度要弱于*ALS*⁶²⁷。结果表明在苯磺隆、双草醚、啶磺草胺处理下*ALS*¹⁷⁹的抗性水平强于*ALS*⁶²⁷,而在1×、5×、10×、20×咪唑乙烟酸下两种抗性材料的抗性水平基本相同(图2)。



96 孔播种板含 3 种水稻; 虚线最左侧为 HH31, 两条虚线中间为 ALS^{i79} , 虚线最右侧为 ALS^{627}

The 96-well seeding plate contains 3 types of rice; The leftmost dashed line is HH31, the middle of the two dashed lines is ALS^{i79} , and the rightmost dashed line is ALS^{627}

图 2 不同种类不同浓度 ALS 类除草剂包衣幼苗长势

Fig.2 Seedling development of ALS herbicide coated with different species and concentrations

2.2.2 4 种 ALS 类除草剂处理对 ALS^{i79} 幼苗高度和根系长度的影响 为研究不同除草剂对突变植株幼苗发育的影响, 本研究测定了 ALS^{i79} 的根系长度和植株高度两种指标。与正常营养液培养的植株相比, 经 1×、5×、10×、20×、30× 除草剂包衣后的 ALS^{i79} 株高与正常培养的 ALS^{i79} 存在显著性差异; 在 5×、10×、30× 苯磺隆, 5× 咪唑乙烟酸, 20×、30× 双草醚, 5×、10×、20×、30× 啶磺草胺下 ALS^{i79} 的根系长度与正常营养液培养的 ALS^{i79} 差异显著, 表明除草剂包衣浸种会对 ALS^{i79} 地上和地下部的生长产生抑制作用。且随着 4 种 ALS 除草剂浓度的不断升高, ALS^{i79} 的植株高度在不同浓度之间也存在显著差异。此外, 除草剂梯度处理的 ALS^{i79} 根系长度均短于对照的根系长度, 且不同浓度之间存在一定的差异。表明在进行除草剂包衣浸种后对 ALS^{i79} 地上部的抑制强于地下部(图 3)。

2.3 ALS 类除草剂喷施条件下对水稻生长的影响及酶活性的变化

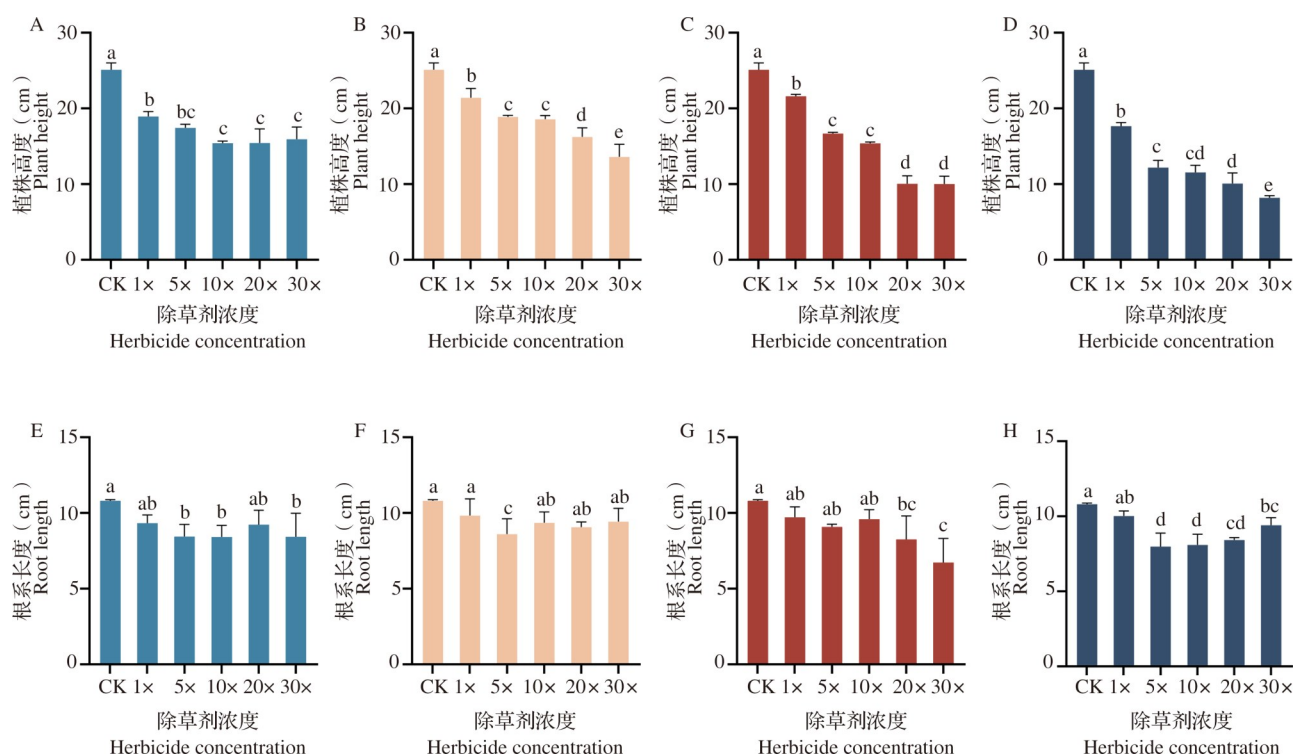
2.3.1 4 种 ALS 类除草剂喷施对水稻生长的影响 待培养至两叶一心期时, 对 3 种水稻(HH31, ALS^{i79} , ALS^{627}) 进行不同 ALS 类除草剂的梯度喷施处理

(图 4)。在苯磺隆梯度处理 15 d 可以发现, 与 ALS^{i79} 和 ALS^{627} 相比 HH31 生长受到较强抑制; 处理 25 d 后, HH31、 ALS^{i79} 、 ALS^{627} 均可正常生长, 在 1×、5× 浓度时, HH31 长势与 ALS^{i79} 基本相同, 但在 30× 浓度下, HH31 生长受到强烈抑制, ALS^{627} 的生长也暂缓且植株高度明显低于 ALS^{i79} 。在咪唑乙烟酸梯度处理 15 d 后, 1× 和 5× 条件下 HH31 开始叶片发黄, 而 ALS^{i79} 和 ALS^{627} 仍能正常生长; 在处理 25 d 后无论在何种梯度下, HH31 均发黄枯死, 而 ALS^{i79} 和 ALS^{627} 在 1× 和 5× 仍能存活, 且 ALS^{627} 的高度明显高于 ALS^{i79} 。在双草醚梯度处理 15 d 后, HH31 从 5× 浓度处理下叶片开始发黄, 而 ALS^{i79} 和 ALS^{627} 仍能正常生长; 处理第 25 d 后, 在 1× 浓度处理下 HH31 的生长受到一定抑制, 在 5× 以上的浓度处理条件下 HH31 叶片发黄或植株枯死, 而 ALS^{i79} 和 ALS^{627} 在所有浓度处理下仍能保持正常的生长, 且二者的株高基本一致。此外, 在啶磺草胺梯度处理第 15 d, 10× 以上的 HH31、 ALS^{i79} 、 ALS^{627} 均死亡; 处理第 25 d, 10×、20×、30× 条件下的 HH31、 ALS^{i79} 、 ALS^{627} 基本枯死, 而较低浓度的 1× 和 5× 条件下 3 种水稻仍能存活, 且 1× 条件下 ALS^{i79} 的株高明显高于 HH31 和 ALS^{627} 。由此可

见,经梯度喷施25 d后, ALS^{179} 和 ALS^{627} 都对4种除草剂表现出对不同程度的抗性。其中在30×苯磺隆以及1×啶磺草胺处理下 ALS^{179} 抗性强于 ALS^{627} ;在5×咪唑乙烟酸处理时, ALS^{179} 抗性要弱于 ALS^{627} ;而在5个浓度的双草醚处理下发现 ALS^{179} 的抗性水平与 ALS^{627} 基本相同。

2.3.2 4种ALS类除草剂对HH31和 ALS^{179} 的ALS、POD、CAT、SOD酶活性的影响 经过不同浓度除草剂处理24 h后,随着4种除草剂处理浓度的增加,野生型HH31和 ALS^{179} 的酶活性在一定程度呈现下降的趋势(图5)。其中,与HH31相比,随着苯磺隆和咪唑乙烟酸浓度的增加, ALS^{179} 的ALS酶活性下降趋势相对较缓,而随着双草醚和啶磺草胺浓度的增加,HH31和 ALS^{179} 的ALS酶活性快速下降且趋势基本一致,表明抗性突变体 ALS^{179} 对于ALS类除草剂敏感性的下降可能是抗性产生的一个主要原因。

但总体来看经过苯磺隆处理后 ALS^{179} 的各项酶活性仍然高于野生型HH31,表明 ALS^{179} 相较于HH31对于清除体内活性氧、自由基等物质的能力较强,能快速恢复正常的新陈代谢。然而,在咪唑乙烟酸处理下, ALS^{179} 的SOD酶活性整体均高于HH31,但在20×和30×下CAT、POD的酶活性却低于HH31,表明过高浓度的除草剂胁迫会引起水稻体内保护酶系统的失衡,进而导致植株死亡。此外,在双草醚处理下 ALS^{179} 的CAT、SOD酶活性普遍高于野生型HH31且在1×和5×处理下呈显著性差异,但是在高浓度的20×和30×处理时差异不显著; ALS^{179} 的POD虽总体高于HH31,但除了1×下差异显著,其他处理浓度下均不存在显著性差异。在啶磺草胺处理下 ALS^{179} 的各项保护酶的酶活性虽总体高于HH31,但仅在较低浓度下差异显著,酶活性在其他处理浓度下均不存在显著性差异。



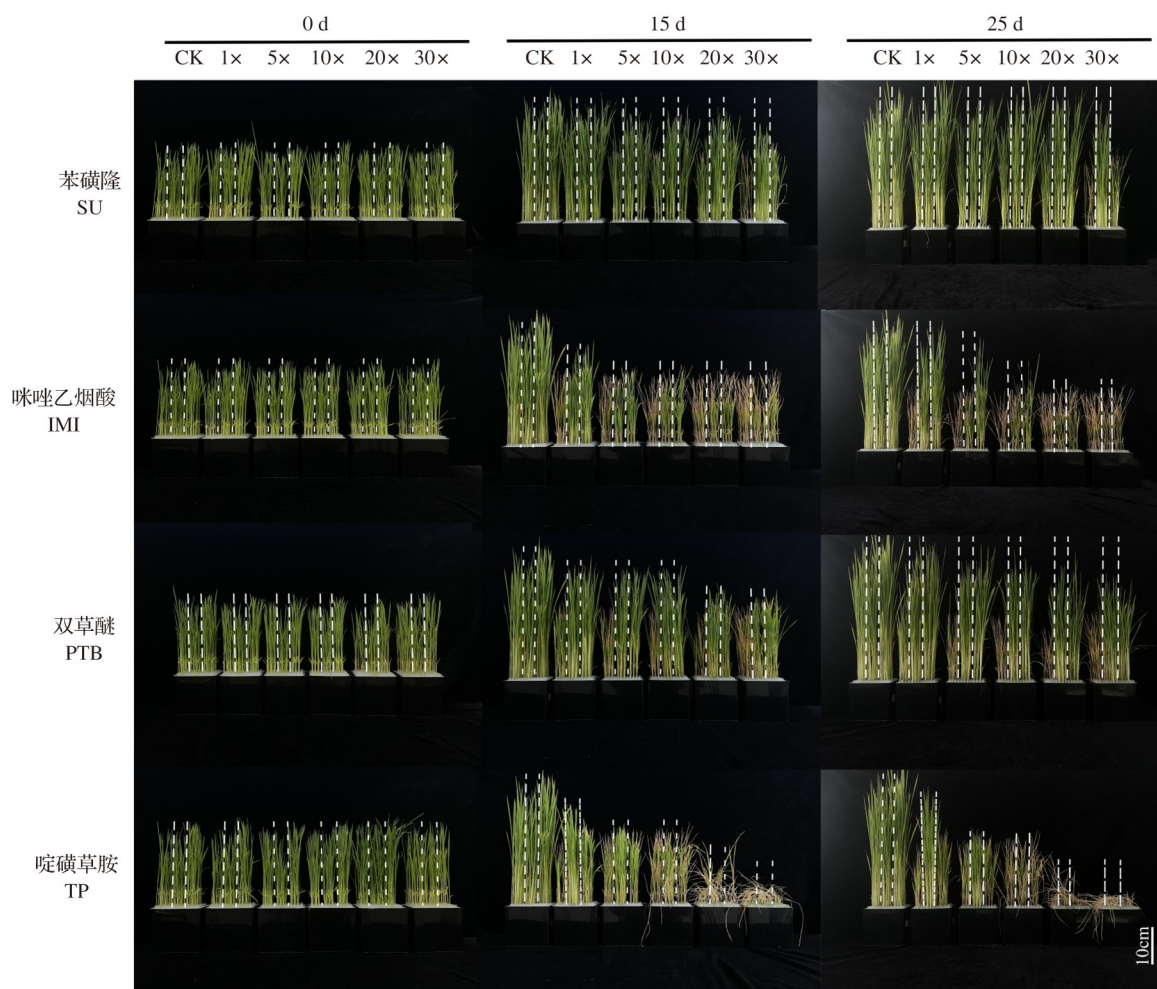
A、E: 苯磺隆; B、F: 咪唑乙烟酸; C、G: 双草醚; D、H: 啶磺草胺; 不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 下同

A, E: Tribenuron-methyl; B, F: Imazethapyr; C, G: Bispyribac-sodium; D, H: Pyroxulam;

Different letters indicated significant difference at $P < 0.05$, the same as below

图3 不同除草剂处理下 ALS^{179} 植株高度与根系长度分析

Fig.3 Analysis of plant height and root length of ALS^{179} under different herbicide treatments

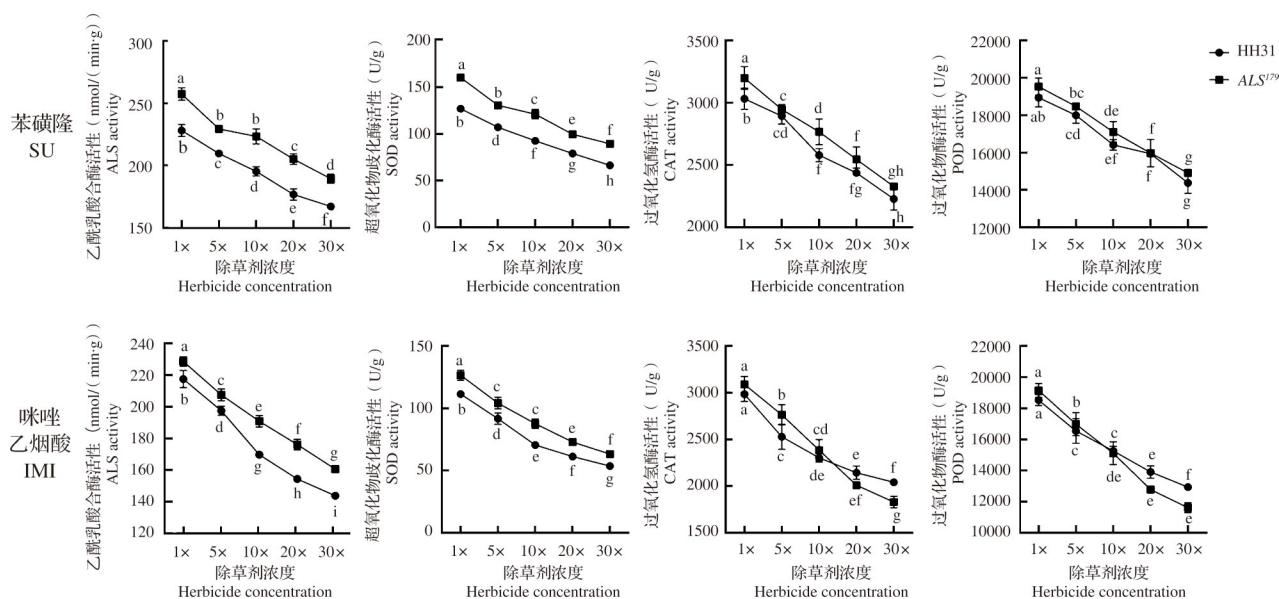


96孔播种板含3种水稻;每个播种板虚线最左侧为HH31,两条虚线中间为 ALS^{179} ,虚线最右侧为 ALS^{627}

The 96-well seeding plate contains 3 types of rice; In each seeding plate, the leftmost dashed line is HH31, the middle of the two dashed lines is ALS^{179} , and the rightmost dashed line is ALS^{627}

图4 3种水稻对不同ALS类除草剂的抗性鉴定

Fig.4 Identification of resistance of three rice varieties to different ALS herbicides



(图5)

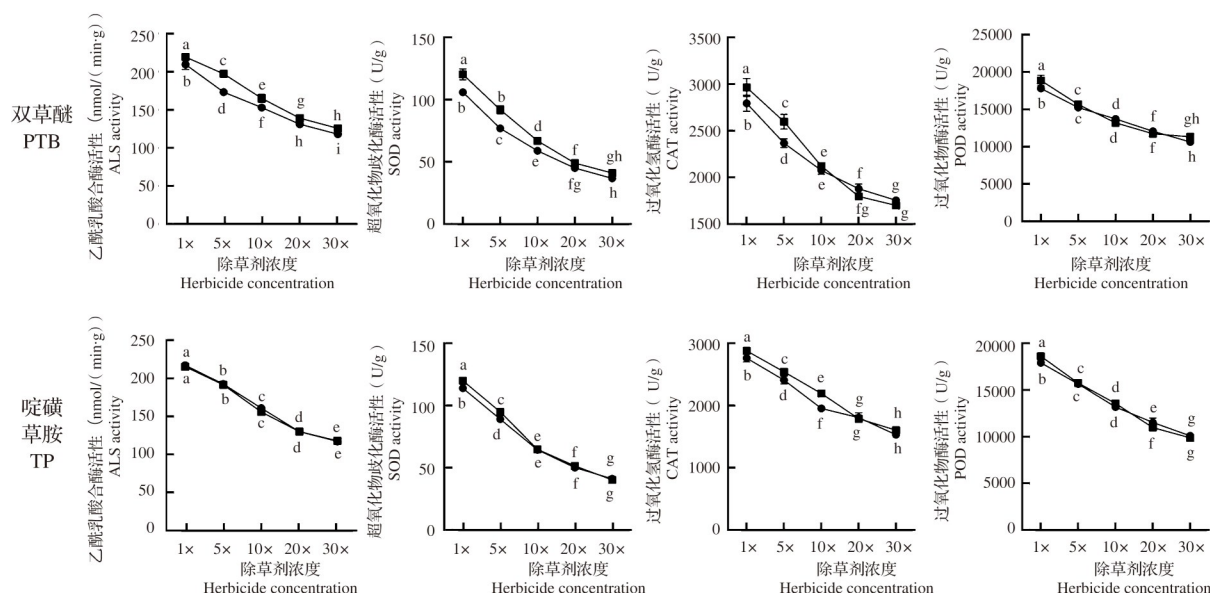


图5 4种ALS类除草剂在不同处理浓度下对水稻ALS、POD、CAT、SOD酶活性的影响

Fig.5 Effects of four ALS herbicides on the activities of ALS, POD, CAT and SOD enzymes in rice under different treatment concentrations

3 讨论

多项研究表明ALS基因上一个或多个位点的突变会导致ALS结构的改变,从而引起ALS与除草剂的结合能力变弱,降低植株对除草剂的敏感性^[33-34]。本研究通过EMS诱变获得了除草剂抗性水稻新种质 ALS^{179} 。发现其不仅对IMI类除草剂具有一定抗性,而且也对SU、PTB、TP类除草剂具有交互抗性。除草剂喷施结果显示,在咪唑乙烟酸和啶磺草胺的1×推荐浓度下可保持植株正常生长,在浓度高达30×的苯磺隆和双草醚处理下也无明显药害反应。为此,本研究认为 ALS^{179} 是对多种ALS类除草剂具有交互抗性的新型水稻材料。

模拟除草剂包衣浸种试验发现, ALS^{179} 对4种ALS类除草剂表现出不同的抗性水平。其中, ALS^{179} 在咪唑乙烟酸、苯磺隆、双草醚处理下表现为高抗,而对啶磺草胺表现出一定的抵抗;比较两种水稻突变体发现,除了在30×咪唑乙烟酸处理下 ALS^{179} 的抗性弱于 ALS^{627} 之外,在其余处理下 ALS^{179} 的抗性水平明显强于 ALS^{627} 。说明 ALS^{627} 可能对苯磺隆、双草醚、啶磺草胺的除草剂包衣浸种更加敏感,而 ALS^{179} 在4种ALS类除草剂包衣后仍能保持一定的耐受能力。结果表明, ALS^{179} 不论是在除草剂包衣剂的选择还是在种子萌发活力上相较于 ALS^{627} 都具有明显优势。

利用除草剂控制田间杂草,提高了劳动效率,但其引发的环境残留危害不容忽视。在我国南方,

稻田通常一年种植2~3次水稻等作物,包括玉米、油菜、瓜果等。本研究发现, $Ala179Val$ 突变赋予对ALS类除草剂广谱抗性。这其中包含有比IMI类残留周期时间短、除草效率高的除草剂,例如SU类、PTB类、TP类等。若利用这些类型除草剂与具有 $Ala179Val$ 突变的ALS类除草剂抗性水稻结合使用,可在一定程度上缓解除草剂残留问题,提高后茬作物种植的安全性。并且,在实际生产过程中,由于除草剂的重复喷洒或机械喷施的问题,很容易造成局部施用超过推荐剂量的情况,导致作物受影响产量。本研究发现, $Ala179Val$ 赋予的对SU和PTB类除草剂抗性是田间推荐剂量的几倍甚至几十倍。因此, $Ala179Val$ 在某种程度上也可提高田间实际生产应用的安全性。此外,本研究所采用的模拟除草剂包衣试验对杂交种子除杂保纯的同时减少土壤中除草剂的药害残留也提供了参考。

ALS是植物体内支链氨基酸生物合成途径的关键酶,也是植物体内ALS类除草剂的唯一作用位点^[35]。体外酶活性测定发现,ALS与植物对除草剂抗性的关系在一定程度上可以通过ALS对除草剂的敏感程度来进行反映。前人的研究表明ALS对除草剂敏感性下降可以使得植物产生对ALS类除草剂的抗性^[6,36-37]。本研究也通过体外酶活性试验测定了ALS酶的活性,发现苯磺隆和咪唑乙烟酸梯度处理后,野生型HH31的ALS酶活性下降趋势强于 ALS^{179} 。由此推测, ALS^{179} 的抗性是一种靶位点抗性机制,是由于ALS对于这两种除草剂敏感性下降

从而产生靶标抗性。

植物体内存在一个多种抗氧化酶相互协调作用的防御体系,可以抑制活性氧对细胞产生的伤害^[38-40]。本研究发现除草剂处理浓度与保护酶活性呈负相关,随着除草剂处理浓度的不断提高,HH31 和 *ALS*¹⁷⁹ 的 SOD、CAT、POD 酶活性也随之不断降低,这与马春英^[41]在扑草净处理 Jingu21 和 Jingu29 下的结果基本一致。此外,在苯磺隆、咪唑乙烟酸、双草醚处理下发现,*ALS*¹⁷⁹ 的各项保护酶活性总体高于 HH31,说明更高的酶活性对活性氧有更强大的抵御能力,有助于清除水稻体内产生的过氧化离子,从而减轻除草剂胁迫。研究发现,不同逆境条件下保护酶体系中发挥主要功能的酶也是不一样的,它们的活性变化在一定程度上反映了植株受胁迫的程度^[42]。本研究中,*ALS*¹⁷⁹ 的 SOD 酶活性整体均高于 HH31,或可表明在受到除草剂胁迫时,SOD 在保护酶系统中发挥着主要功能^[43]。然而,在受到 10× 以上的咪唑乙烟酸处理时,*ALS*¹⁷⁹ 体内 SOD 酶活性虽高于 HH31,但 CAT、POD 的酶活性却低于 HH31,这可能是处理浓度过高,使得 *ALS*¹⁷⁹ 无法产生抗性,与 HH31 一样死亡,造成酶活性出现差异。因此,当除草剂施用量超过一定限度时,并不利于植物的正常生长,甚至会引起生物体内保护酶系统的失调^[44]。

综上,本研究发现了乙酰乳酸合酶 Ala179Val 突变可以赋予水稻对 ALS 类除草剂的广谱抗性,为后续 ALS 类除草剂广谱抗性水稻品系的培育提供了遗传种质资源。

参考文献

- [1] Heap I, Duke S O. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 2018, 74(5): 1040-1049
- [2] Gould F, Brown Z S, Kuzma J. Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance. *Science*, 2018, 360(6390): 728-732
- [3] 陈雷, 金曼, 张维乐, 王承旭, 吴勇斌, 王治忠, 唐晓艳. 杂草稻的特性及其危害与防治研究进展. *作物学报*, 2020, 46(7): 969-977
Chen L, Jin M, Zhang W L, Wang C X, Wu Y B, Wang Z Z, Tang X Y. Research advances on characteristics, damage and control measures of weedy rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(7): 969-977
- [4] 黄开红, 李永丰, 李宜慰, 郑红, 朱普平. 轻型栽培稻田杂草发生及其危害性研究. *江西农业大学学报*, 1999, 23(1): 47-49
Huang K H, Li Y F, Li Y W, Zheng H, Zhu P P. Emergence and damage of weeds in paddy field of four lightculture methods. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 1999, 23(1): 47-49
- [5] Green J M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1351-1357
- [6] Piao Z Z, Wang W, Wei Y N, Zonta F, Wan C Z, Bai J J, Wu S J, Wang X Q, Fang J. Characterization of an acetohydroxy acid synthase mutant conferring tolerance to imidazolinone herbicides in rice (*Oryza sativa*). *Planta*, 2018, 247(3): 693-703
- [7] 牟同敏. 中国两系法杂交水稻研究进展和展望. *科学通报*, 2016, 61(35): 3761-3769
Mou T M. The research progress and prospects of two-line hybrid rice in China. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(35): 3761-3769
- [8] 肖国樱. 作物对除草剂的抗性及其在杂种优势利用中应用策略的探讨. *杂交水稻*, 1997, 12(5): 1-3
Xiao G Y. The view of crop herbicide resistance for heterosis utilization. *Hybrid Rice*, 1997, 12(5): 1-3
- [9] 温莉娟, 周菲, 邹玉兰. 抗除草剂转基因水稻的研究进展. *植物保护学报*, 2018, 45(5): 954-960
Wen L X, Zhou F, Zou Y L. The research progress on herbicide resistant transgenic rice development. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(5): 954-960
- [10] 周延彪, 秦鹏, 赵新辉, 杨远柱. 抗除草剂水稻种质资源研究进展. *杂交水稻*, 2019, 34(1): 1-5
Zhou Y B, Qin P, Zhao X H, Yang Y Z. Research progress of herbicide-resistant rice genetic resource. *Hybrid Rice*, 2019, 34(1): 1-5
- [11] Zhang R, Chen S, Meng X B, Chai Z Z, Wang D L, Yuan Y G, Chen K L, Jiang L J, Li J Y, Gao C X. Generating broad-spectrum tolerance to ALS-inhibiting herbicides in rice by base editing. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(10): 1624-1633
- [12] Vermij P. Liberty link rice raises specter of tightened regulations. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(11): 1301-1302
- [13] Li J, Meng X B, Zong Y, Chen K L, Zhang H W, Liu J X, Li J Y, Gao C X. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16139
- [14] Liu X, Deng X J, Li C Y, Xiao Y K, Zhao K, Guo J, Yang X R, Zhang H S, Chen C P, Luo Y T, Tang Y L, Yang B, Sun C H, Wang P R. Mutation of protoporphyrinogen IX oxidase gene causes spotted and rolled leaf and its overexpression generates herbicide resistance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5781
- [15] Tan S, Evans R R, Dahmer M L, Singh B K, Shaner D L. Imidazolinone-tolerant crops: History, current status and future. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 2005, 61(3): 246-257
- [16] Dauer J, Hulting A, Carlson D, Mankin L, Harden J, Mallory-Smith C. Gene flow from single and stacked herbicide-

- resistant rice (*Oryza sativa*): Modeling occurrence of multiple herbicide-resistant weedy rice. *Pest Management Science*, 2018, 74(2): 348-355
- [17] Jin M, Chen L, Deng X W, Tang X Y. Development of herbicide resistance genes and their application in rice. *The Crop Journal*, 2022, 10(1): 26-35
- [18] 刘定富, 尹合兴, 应继锋. 中国水稻百年育种的一些关键基因. *中国稻米*, 2022, 28(2): 1-11
- Liu D F, Yin H X, Ying J F. Key genes in century rice breeding in China. *China Rice*, 2022, 28(2): 1-11
- [19] Maeda H, Murata K, Sakuma N, Takei S, Yamazaki A, Karim M R, Kawata M, Hirose S, Kobayashi M K, Taniguchi Y, Suzuki S, Sekino K, Ohshima M, Kato H, Yoshida H, Tozawa Y. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides. *Science*, 2019, 365(6451): 393-396
- [20] Yu Q, Powles S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1340-1350
- [21] Garcia M D, Nouwens A, Lonhienne T G, Guddat L W. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(7): E1091-E1100
- [22] 吴云雨, 肖宁, 余玲, 蔡跃, 潘存红, 李育红, 张小祥, 黄年生, 周长海, 季玲娟, 戴正元, 李爱宏. 我国抗除草剂水稻种质创制研究进展. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4): 890-899
- Wu Y Y, Xiao N, Yu L, Cai Y, Pan C H, Li Y H, Zhang X X, Huang N S, Zhou C H, Ji H J, Dai Z Y, Li A H. Research progress in herbicide-resistant rice germplasm innovation in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 890-899
- [23] Li J, Li M, Gao X X, Fang F. A novel amino acid substitution Trp574Arg in acetolactate synthase (ALS) confers broad resistance to ALS-inhibiting herbicides in crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Management Science*, 2017, 73(12): 2538-2543
- [24] Qiu J, Jia L, Wu D Y, Weng X F, Chen L J, Sun J, Chen M H, Mao L F, Jiang B W, Ye C Y, Turra G M, Guo L B, Ye G Y, Zhu Q H, Imaizumi T, Song B K, Scarabel L, Jr A M, Olsen K M, Fan L J. Diverse genetic mechanisms underlie worldwide convergent rice feralization. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 1-11
- [25] Ruzmi R, Ahmad-Hamdani M S, Mazlan N. Ser-653-Asn substitution in the acetohydroxyacid synthase gene confers resistance in weedy rice to imidazolinone herbicides in Malaysia. *PLoS ONE*, 2020, 15(9): e0227397
- [26] Sudianto E, Beng-Kah S, Ting-Xiang N, Saldain N E, Scott R C, Burgos N R. Clearfield® rice: Its development, success, and key challenges on a global perspective. *Crop Protection*, 2013, 49: 40-51
- [27] 杜慧平, 杜慧玲. 苯磺隆在土壤中的消解动态和残留测定. *山西农业科学*, 2015, 43(1): 50-53
- Du H P, Du H L. Tribenuron-methyl degradation dynamics and residual in soil. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43(1): 50-53
- [28] 黄文源. 我国典型土壤农残快速检测方法及其降解模型建立. 贵阳: 贵州大学, 2020
- Huang W Y. Establishment of rapid detection methods and degradation models of pesticide residues in typical soils in China. Guiyang: Guizhou University, 2020
- [29] 孙明娜, 王梅, 余璐, 朱玉杰, 董旭, 肖青青, 刘艳萍, 孙海滨, 段劲生, 高同春. 基质分散固相-液质联用法检测稻田水和土壤中氟氟草酯和双草醚残留. *环境化学*, 2017, 36(3): 691-694
- Sun M N, Wang M, Yu L, Zhu Y J, Dong X, Xiao Q Q, Liu Y P, Sun H B, Duan J S, Gao T C. Residue and decline study of cyhalofop-butyl and bispyribac-sodium in paddy water and soil by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(3): 691-694
- [30] 毛江胜, 陈子雷, 郭长英, 李慧冬, 方丽萍, 张文君, 丁蕊艳. 氟唑磺隆与炔草酯在小麦及土壤中的降解动力学研究. *山东农业科学*, 2020, 52(7): 146-150
- Mao J S, Chen Z L, Guo C Y, Li H D, Fang L P, Zhang W J, Ding R Y. Degradation kinetics of flucarbazone and clodinafop-propargyl in wheat and soil. *Shandong Agricultural Sciences*, 2020, 52(7): 146-150
- [31] 贺文艳, 毛萌. 五氟磺草胺在稻田环境中吸附和消解研究进展. *农药学报*, 2018, 20(2): 146-152
- He W Y, Mao M. Research progresses on adsorption and dissipation of penoxsulam in rice paddy field. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(2): 146-152
- [32] Wang Z Y, Han Y L, Luo S, Rong X M, Song H X, Jiang N, Li C W, Yang L. Calcium peroxide alleviates the waterlogging stress of rapeseed by improving root growth status in a rice-rapeseed rotation field. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1048227
- [33] Guo Y, Cheng L, Long W H, Gao J Q, Zhang J F, Chen S, Pu H M, Hu M L. Synergistic mutations of two rapeseed AHAS genes confer high resistance to sulfonylurea herbicides for weed control. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133: 2811-2824
- [34] Lonhienne T, Garcia M D, Pierens G, Mobli M, Nouwens A, Guddat L W. Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(9): E1945-E1954
- [35] Lonhienne T, Cheng Y, Garcia M D, Hu S H, Low Y S, Schenk G, Williams C M, Guddat L W. Structural basis of resistance to herbicides that target acetohydroxyacid synthase. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3368
- [36] Huang Z F, Chen J Y, Zhang C X, Huang H J, Wei S H, Zhou X X, Chen J C, Wang X. Target-site basis for resistance to imazethapyr in redroot amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 128: 10-15
- [37] Hu M L, Pu H M, Kong L N, Gao J Q, Long W H, Chen S,

- Zhang J F, Qi C K. Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production. *Molecular Breeding*, 2015, 35: 46
- [38] 刘欢, 慕平, 赵桂琴, 周向睿. 除草剂对燕麦产量及抗氧化特性的影响. *草业学报*, 2015, 24(2): 41-48
- Liu H, Mu P, Zhao G Q, Zhou X R. The impact of herbicides on production and antioxidant properties of oats. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(2): 41-48
- [39] 申建芳, 东保柱, 曹丽霞, 赵桂琴, 张笑宇, 周洪友. 田普除草剂对燕麦的胁迫及燕麦除草剂胁迫下的修复. *中国农学通报*, 2018, 34(7): 152-156
- Shen J F, Dong B Z, Cao L X, Zhao G Q, Zhang X Y, Zhou H Y. Stress of pendimethalin on oat and oat plant repair under stress. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(7): 152-156
- [40] 王鑫, 郭平毅, 原向阳, 姚满生. 2,4-D 丁酯对罂粟(*Papaver somniferum* L.) 保护酶活性及脂质过氧化作用的影响. *生态学报*, 2008(3): 1098-1103
- Wang X, Guo P Y, Yuan X Y, Yao M S. Effect of 2, 4-D on the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.). *Acata Ecologica Sinica*, 2008(3): 1098-1103
- [41] 马春英. 不同品种谷子对单嘧磺隆和扑草净耐药性差异的生理机制. 太谷: 山西农业大学, 2021
- Ma C Y. Physiological resistance mechanism of foxtail millet with different herbicide-resistance to Monosulfuron and Prometryn. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2021
- [42] 赵娟, 尹艺臻, 王晓璐, 马春英, 尹美强, 温银元, 宋喜娥, 董淑琦, 杨雪芳, 原向阳. 不同品种谷子愈伤组织对拿捕净胁迫的生理响应. *中国农业科学*, 2020, 53(5): 917-928
- Zhao J, Yin Y Z, Wang X L, Ma C Y, Yin M Q, Wen Y Y, Song X E, Dong S Q, Yang X F, Yuan X Y. Physiological response of millet callus with different herbicide-resistance to sethoxydim stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(5): 917-928
- [43] 何林池, 王康, 魏小云, 荣平, 王亚峰. 耐盐差异性不同棉花品种的抗氧化酶活性及 SNP/InDel 分析. *江苏农业学报*, 2014, 30(5): 980-985
- He L C, Wang K, Wei X Y, Rong P, Wang Y F. Antioxidant enzyme activities and SNP/InDel analysis of cotton varieties differring in salt tolerance. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(5): 980-985
- [44] 杨雯一. 不同胁迫对各种植物体内抗氧化酶系统的影响综述. *化工管理*, 2021, (1): 92-93
- Yang W Y. A review of the effects of different stresses on antioxidant enzyme systems in various plants. *Chemical Enterprise Management*, 2021(1): 92-93