

# 油菜种质 M196 对 ALS 类除草剂的交互抗性评价 与抗性基因 *BnAHAS1-3R* 的表达分析

卢鑫宇<sup>1,2</sup>, 郭月<sup>2</sup>, 祁余容<sup>2,3</sup>, 王婷<sup>1,2</sup>, 李伟龙<sup>2,3</sup>, 吕欣蕾<sup>2,4</sup>, 钟詹斐<sup>2,3</sup>,  
彭琦<sup>2</sup>, 高建芹<sup>2</sup>, 张洁夫<sup>2</sup>, 胡茂龙<sup>1,2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学生命科学学院, 镇江 212013; <sup>2</sup>江苏省农业科学院经济作物研究所/国家油料作物改良中心南京分中心/农业农村部长江下游棉花与油菜重点实验室/江苏省农业生物学重点实验室, 南京 210014; <sup>3</sup>福建农林大学农学院, 福州 350002; <sup>4</sup>南京农业大学农学院, 南京 210095)

**摘要:** 为明确抗 ALS 类除草剂油菜新种质 M196 的除草剂交互抗性效应及其抗性基因 *BnAHAS1-3R* 的功能, 本研究以抗性油菜 M196 及野生型 N131 为材料, 在油菜苗期 3~5 叶期, 按照田间推荐使用浓度 0×、1/4×、1/2×、1×、2×、4× 的磺酰脲(SU)、磺酰胺基三唑啉酮(SCT)、咪唑啉酮(IMI)、三唑嘧啶(TP)和嘧啶水杨酸(PB)等 5 种 ALS 抑制剂除草剂进行喷施处理, 鉴定评价 M196 对各类除草剂的抗性效应。结果表明, M196 对 SU 和 SCT 除草剂交互抗性最强, 对 IMI、TP 和 PB 抗性较低。大田鉴定进一步验证了温室交互抗性结果。转抗性基因 *BnAHAS1-3R* 拟南芥功能验证表明, 转基因阳性植株对各除草剂交互抗性 with 油菜 M196 的抗性趋势一致。qRT-PCR 分析与转基因拟南芥体外酶活抑制试验结果均表明, M196 对 ALS 类除草剂交互抗性的产生, 是由突变靶基因 *BnAHAS1-3R* 的表达量增加以及突变靶标酶对除草剂的敏感性下降导致。研究结果为预防和解决利用抗性基因选育的品种大面积推广后可能带来的杂草抗药性以及抗性基因漂移等问题提供了理论依据。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 抗除草剂新种质; 交互抗性; 功能分析

## Evaluation of Cross Resistance to ALS Herbicides and Expression Analysis of Resistance Gene *BnAHAS1-3R* in Rapeseed M196

LU Xinyu<sup>1,2</sup>, GUO Yue<sup>2</sup>, QI Yurong<sup>2,3</sup>, WANG Ting<sup>1,2</sup>, LI Weilong<sup>2,3</sup>, LYU Xinlei<sup>2,4</sup>, ZHONG Zhanfei<sup>2,3</sup>,  
PENG Qi<sup>2</sup>, GAO Jianqin<sup>2</sup>, ZHANG Jiefu<sup>2</sup>, HU Maolong<sup>1,2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212023; <sup>2</sup>Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Nanjing Sub-center, National Center of Oil Crops Improvement/Key Laboratory of Cotton and Rapeseed (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Jiangsu Key Laboratory for Agro-Biology, Nanjing 210014; <sup>3</sup>College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; <sup>4</sup>College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** In order to identify effects of the cross-resistance and the function of resistant genes *BnAHAS1-3R* in germplasm M196, this study examined the resistance effect of rapeseed M196 and N131 (wild type) by spraying sulfonylurea, sulfonylaminocarbonyl-triazolinone, imidazolinone, triazolopyrimidine, and pyrimidyl-

收稿日期: 2024-03-19 网络出版日期: 2024-10-15

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240319002>

第一作者主要从事油菜分子遗传学研究, E-mail: 1665292344@qq.com; 郭月为共同第一作者

通信作者: 胡茂龙, 主要从事油菜遗传与分子育种研究, E-mail: huml@jaas.ac.cn

**基金项目:** 科技创新 2030—重大项目 (2023ZD0404203); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31901503); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(23)1001-1); 江苏省农业生物学重点实验室重大自主科研项目 (JKLA2021-ZD02); 国家农业现代产业技术体系建设专项 (CARS-12); 江苏省重点研发计划项目 (BE2021405)

**Foundation projects:** Science and Technology Innovation 2030—Major Program (2023ZD0404203); Youth Fund of the National Natural Science Foundation of China (31901503); Jiangsu Province Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund Project (CX(23)1001-1); Major Independent Research Project of Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agricultural Biology (JKLA2021-ZD02); National Agricultural Modern Industrial Technology System Construction Project (CARS-12); Jiangsu Province Key Research and Development Project (BE2021405)

benzoate with different concentration gradients (0, 1/4, 1/2, 1, 2 and 4 times the recommended concentration of herbicides in the field), respectively, at 3-5 leaf stage. Based on the greenhouse and field results, the cross-resistance of SU and SCT was observed simultaneously to be the strongest, while IMI, TP and PB were lower. Results of qRT-PCR and *in vitro* enzyme inhibition experiments in transgenic *Arabidopsis* indicated that the cross-resistance of ALS herbicides was caused by the elevated expression of the mutated allele of *BnAHAS1-3R* and the decrease on enzyme sensitivity to herbicides. The study provides a theoretical basis for preventing and resolving the potential problems about weed resistance and drift of resistance gene that may arise from the widespread promotion of resistant varieties.

**Key words:** *Brassica napus* L.; herbicide resistant new germplasm; cross-resistance; function analysis

油菜是世界四大油料作物之一,是我国第一大油料作物,菜籽油占我国国产食用植物油来源的半数以上。然而,田间杂草伴随油菜整个生长周期,与之争夺阳光、水分、养分、携带病虫害,可导致油菜减产15%~50%,同时带来品质下降,严重危害了油菜产业的高质量发展<sup>[1-3]</sup>。油菜田间杂草主要包括阔叶型杂草、禾本科杂草及其他杂草。在农业现代化进程中,除草剂的化学防治是应用最为广泛的杂草防控方法<sup>[4]</sup>,其中ALS类除草剂具有较高的市场占有率,已成为世界应用最广泛的除草剂之一。

ALS除草剂以乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)为靶标。除草原理主要是阻碍植物支链氨基酸合成,破坏蛋白质代谢,此外除草剂胁迫还能造成植物体内2-酮丁酸或2-氨基丁酸的积累,重要代谢通路中间产物的耗尽以及光合、呼吸作用的破坏等,最终会导致植物死亡从而达到除草目的<sup>[5]</sup>。ALS除草剂以茎叶吸收为主,兼有封闭作用,具有选择性强、低量高效、杀草谱广、控草期长、对哺乳动物和环境安全等优点,在作物大田和非耕地广泛使用<sup>[6]</sup>。ALS除草剂按化学结构可分为5类<sup>[7]</sup>:磺酰脲(SU, sulfonylurea)、磺酰胺羧基三唑啉酮(SCT, sulfonlyaminocarbonyl-triazolinone)、咪唑啉酮(IMI, imidazolinone)、三唑嘧啶类(TP, triazolopyrimidine)、嘧啶水杨酸(PB, pyrimidylbenzoate)。其中,SU类主要种类有苯磺隆、噻吩磺隆和苄嘧磺隆等,多用于稻、麦和玉米田,用于阔叶杂草的防除;SCT类主要种类有噻酮磺隆和氟唑磺隆等,用于麦田对野燕麦和看麦娘等禾本科杂草和部分阔叶杂草的防除;IMI类主要种类有咪唑乙烟酸、咪唑烟酸、甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟等,主要作用于大豆田;TP类主要有五氟磺草胺和双氟磺草胺等,分别用于稻田和麦田,其对已产生SU抗性的杂草也有较好的防效;PB类种类有双草醚和嘧啶肟草醚等,用于稻田防除一年生和多年生杂草。

除草剂交互抗性是一种由于遗传因素改变造成的,能使植物对不同类型除草剂产生抗性的能力<sup>[8]</sup>。多数情况下作物及杂草中ALS除草剂抗性的产生,与基因突变导致ALS靶标酶氨基酸残基改变,进而引起植物对除草剂的敏感性下降有关,或者与ALS基因表达量增加有关。目前已鉴定出的与ALS除草剂抗性产生有关的突变位点主要有:Ala122、Ala205、Asp376、Arg377、Gly654、Pro197、Ser653和Trp574(以拟南芥ALS的氨基酸位置计算,下同)<sup>[4]</sup>。并且植物对ALS抑制除草剂交互抗性水平的差异与ALS靶基因发生突变对应的蛋白氨基酸突变类型有关<sup>[9]</sup>,如Pro197、Trp574位点突变通常会产生较高的SU抗性,但在有些植物中发现其对IMI和TP除草剂<sup>[10-12]</sup>表现为低抗性。Arg377位点改变能使杂草同时获得SU、TP和SCT除草剂抗性,而Asp376位点突变甚至使野慈姑具有5种ALS除草剂抗性<sup>[13-14]</sup>。

M196是从高抗SU除草剂双位点突变新种质DS3和野生型N131杂交得到的F<sub>2</sub>代群体中分离出的单位点突变抗性新种质<sup>[15]</sup>。油菜中有*BnAHAS1*和*BnAHAS3*两个高度同源的ALS除草剂抗性靶基因<sup>[6]</sup>,M196抗性源于靶基因*BnAHAS1*对应蛋白的197位点脯氨酸被亮氨酸替换<sup>[15]</sup>。前期研究表明,M196对SU除草剂苯磺隆抗性水平为除草剂推荐使用剂量的2~3倍,对甲基二磺隆抗性水平为1倍的推荐使用剂量,但其对其他几种ALS除草剂抗性还不清楚。本研究以油菜种质M196为研究对象,比较鉴定M196对5类ALS抑制除草剂的交互抗性效应差异,并通过拟南芥转基因试验分析抗性基因*BnAHAS1-3R*功能。研究结果对进一步筛选抗性材料适用除草剂范围以提高除草效果,以及防治未来抗性品种推广利用可能产生的杂草抗药性和抗性基因漂移等问题都具有重要意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

供试野生型油菜 N131 和抗 ALS 类除草剂油菜 M196<sup>[15]</sup> 种子,皆由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。

ALS 抑制除草剂共选取 10 种,属于 5 个不同大

类,每类选取代表性除草剂 2 种。SU 除草剂为苄嘧磺隆和噻吩磺隆,SCT 除草剂为噻酮磺隆和氟唑磺隆,IMI 除草剂为咪唑乙烟酸和甲氧咪草烟,TP 除草剂为双氟磺草胺和五氟磺草胺,PB 除草剂为双草醚和嘧啶肟草醚。各除草剂的有效成分含量、田间推荐使用浓度、制造商等信息详见表 1,并将田间推荐使用浓度记为 1× 喷药浓度。

表 1 除草剂类别、使用浓度及制造商

Table 1 Herbicide categories, concentrations and manufacturer

| 除草剂类别<br>Herbicide<br>category | 除草剂<br>Herbicide | 田间推荐使用浓度<br>Recommended concentration<br>for field use | 对应国标单位浓度<br>Corresponding to the<br>national standard unit<br>concentration | 制造商<br>Manufacturer |
|--------------------------------|------------------|--|---|---------------------|
| SU                             | 10 % 苄嘧磺隆        | 20 g/667 m <sup>2</sup>                                | 0.16 mmol/L   | 江苏快达农化股份有限公司        |
|                                | 25 % 噻吩磺隆        | 8 g/667 m <sup>2</sup>                                 | 0.17 mmol/L   | 安徽丰乐农化有限责任公司        |
| SCT                            | 99.5 % 噻酮磺隆      | 4 g/667 m <sup>2</sup>                                 | 0.34 mmol/L   | 美国 TMstandard 公司    |
|                                | 70 % 氟唑磺隆        | 20 g/667 m <sup>2</sup>                                | 1.12 mmol/L   | 爱利思达生物化学品北美有限公司     |
| IMI                            | 5 % 咪唑乙烟酸        | 133 mL/667 m <sup>2</sup>                              | 0.72 mmol/L   | 山东先达化工有限公司          |
|                                | 4 % 甲氧咪草烟        | 80 mL/667 m <sup>2</sup>                               | 0.35 mmol/L   | 江苏中旗科技股份有限公司        |
| TP                             | 50 g/L 双氟磺草胺     | 6 mL/667 m <sup>2</sup>                                | 2.78 μmol/L   | 江苏华农生物化学有限公司        |
|                                | 25 g/L 五氟磺草胺     | 80 mL/667 m <sup>2</sup>                               | 0.34 mmol/L   | 科迪华农业科技公司           |
| PB                             | 10 % 双草醚         | 20 mL/667 m <sup>2</sup>                               | 0.15 mmol/L   | 海特农化有限公司生产          |
|                                | 5 % 嘧啶肟草醚        | 50 mL/667 m <sup>2</sup>                               | 0.14 mmol/L   | 稻农信-青岛闲农抗性杂草防治有限公司  |

### 1.2 除草剂配比及喷施方法

生长室内处理:于 2023 年 6 月江苏省农科院生长室萌发油菜 N131 及 M196 后,移栽至营养土中,置于人工气候室(光照周期 14 h 光/10 h 暗,温度 23 ℃)中培养至 3~5 叶期,分别按照 10 种除草剂田间推荐使用浓度的 0、1/4×、1/2×、1×、2×、4× 对油菜幼苗进行茎叶喷施(表 1),每个处理 3 盆重复,每盆 4 株。

田间处理:于 2023 年 10 月在江苏省农科院区试田种植油菜 N131 及 M196。两种材料分区种植,每个小区分为 5 行。每种材料 6 个小区对应 5 类除草剂处理(5 小区)以及 0× 处理组,各除草剂处理小区每个 5 行分别对应 1/4×、1/2×、1×、2× 和 4× 不同除草剂浓度。行长 2 m,行距 0.4 m,每行移栽 20 株四叶一心期油菜幼苗,用一种除草剂的一个浓度进行处理。移栽 2 周后,茎叶喷施噻吩磺隆、噻酮磺隆、咪唑乙烟酸、双氟磺草胺和双草醚 5 类除草剂,同类同种浓度除草剂喷施一行,喷施过程中使用挡板进行隔离,避免喷洒到相邻行油菜。

### 1.3 ALS 类除草剂交互抗性鉴定

待 N131 及 M196 生长至 3~5 叶期喷施各除草剂,3 周后,采用整株测定法和目测法鉴定油菜抗性水平。将抗性效应等级分为 3 类:抗性(植株长势良

好无明显药害);中抗(植株受到药害叶片褪绿变黄,但最终未死亡);敏感(植株死亡)<sup>[13]</sup>。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析

对室内生长至 3~5 叶期的 N131 及 M196 喷施 4× 田间推荐使用浓度的噻吩磺隆、噻酮磺隆、咪唑乙烟酸、双氟磺草胺和双草醚等除草剂,并在喷施除草剂后的 0 h、12 h、24 h 摘取新鲜油菜叶片,液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱备用。液氮研磨后使用 OminiPlant RNA Kit(全能型植物 RNA 提取盒)提取叶片 RNA,并将 RNA 浓度统一稀释到 500 ng/μL,根据 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix(快速去基因组逆转录预混液)试剂盒说明书逆转录得到 cDNA。由于油菜 *ALS1* 和 *ALS3* 基因编码区序列同源性极高,采用探针法进行 qRT-PCR 分析以提高准确性,内参基因选用真核翻译起始因子 4B(*EIF4B*) 基因<sup>[15]</sup>。20 μL 扩增体系:3 μL cDNA、10 μL Mix、共 3.6 μL 扩增引物、0.8 μL 探针引物(p)、2.6 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。试验过程包含 3 个生物学重复及 3 个技术重复。

qRT-PCR 采用 ABI7500 实时 PCR 系统(美国应用生物系统公司),涉及引物及探针序列见表 2,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,OminiPlant

RNA Kit(全能型植物 RNA 提取盒)和 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix(快速去基因组逆转

录预混液)试剂盒购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司,结果采用 Origin 2021 软件绘制。

表 2 本研究中所用到的引物序列

Table 2 The primers sequences used in study

| 引物<br>Primer | 引物序列 (5'→3')<br>Sequence (5'→3') | 用途<br>Use    |
|--------------|----------------------------------|--------------|
| ALSI-F1      | AGAACAGTTAGATCCAC                | 基因克隆         |
| ALSI-R1      | CAGCTTCATCTCTCAGTA               | 基因克隆         |
| ALSI-F2*     | CGCGGTACCTCATCTCTCTCTCTAACC      | 载体构建         |
| ALSI-R2*     | CGCACTAGTGATCACCAGCTTCATCTCTC    | 载体构建         |
| ALSI-F2      | TTCTCCTTAACCCACAGAAAGA           | qRT-PCR      |
| ALSI-R2      | GGGAGCGTAGCGGGAGAC               | qRT-PCR      |
| ALSI-P       | CCGTCAATGTCGCACCTCCTTCC          | qRT-PCR 探针   |
| EIF4B-F      | GTGAGCTGGACGACAAAGTC             | qRT-PCR      |
| EIF4B-R      | CTCTGATCATCGGCAGGTCT             | qRT-PCR      |
| EIF4B-P      | TGCCTGCACCAGACCCGGGT             | qRT-PCR 探针   |
| UA1-F        | GCCCTGCCTTCATACGCTAT             | 转基因植株 PCR 鉴定 |
| UA1-R        | TCTGCTAACCCGCTGACGAG             | 转基因植株 PCR 鉴定 |

### 1.5 M196 的遗传基因抗性转化及 PCR 鉴定

根据 M196 的基因序列 *BnAHASI-3R*<sup>[15]</sup>,用引物 *ALSI-F2\*/R2\**进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系:1.0 μL DNA 模板、10 mmol/L 引物 *ALSI-F2\*/R2\**各 1 μL、11.0 μL H<sub>2</sub>O、2.0 μL 10×PCR Buffer、2.0 μL 2 mmol/L dNTPs (2 mmol/L dATP, dGTP, dCTP, dTTP each)、1.2 μL 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.8 μL 1 U/L KOD Plus Taq 酶。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。用 *Kpn* I 和 *Spe* I 双酶切 PCR 回收产物获得目的片段,通过 T4 连接酶连接到同样经过双酶切的载体上,获得重组载体 pBnAHAS1-3R。转化大肠杆菌 DH5α,挑取单菌落测序鉴定。将测序正确的菌液扩繁、保菌后提取质粒并转入根癌农杆菌 EHA105 菌株,采用农杆菌侵染花序法转化拟南芥,筛选得到纯合株系。

取转基因拟南芥纯合植株新鲜叶片,提取基因组 DNA。使用特异性引物 UA1-F/R<sup>[16]</sup>,进行 PCR 鉴定(表 2)。PCR 扩增体系:1.0 μL DNA 模板、10 mmol/L 引物 UA1-F/R 各 1 μL、13.0 μL H<sub>2</sub>O、2.0 μL 10×PCR Buffer、2.0 μL 2 mmol/L dNTPs (2 mmol/L dATP, dGTP, dCTP, dTTP each)、1.2 μL 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.8 μL 1 U/L KOD Plus Taq 酶。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳法进行鉴定<sup>[17]</sup>,纯水作为阴性对照。

### 1.6 转基因拟南芥 ALS 类除草剂交互抗性鉴定

选用 T<sub>3</sub> 代拟南芥转基因阳性株系,编号为 T2、T3、T4,进行交互抗性鉴定。转基因拟南芥培养 3 周后,茎叶喷施田间推荐使用浓度的 1/4×、1/2×、1×、2×、4× 的各类 ALS 除草剂(噻吩磺隆、噻酮磺隆、咪唑乙烟酸、双氟磺草胺和双草醚)。

### 1.7 转基因拟南芥体外酶活试验

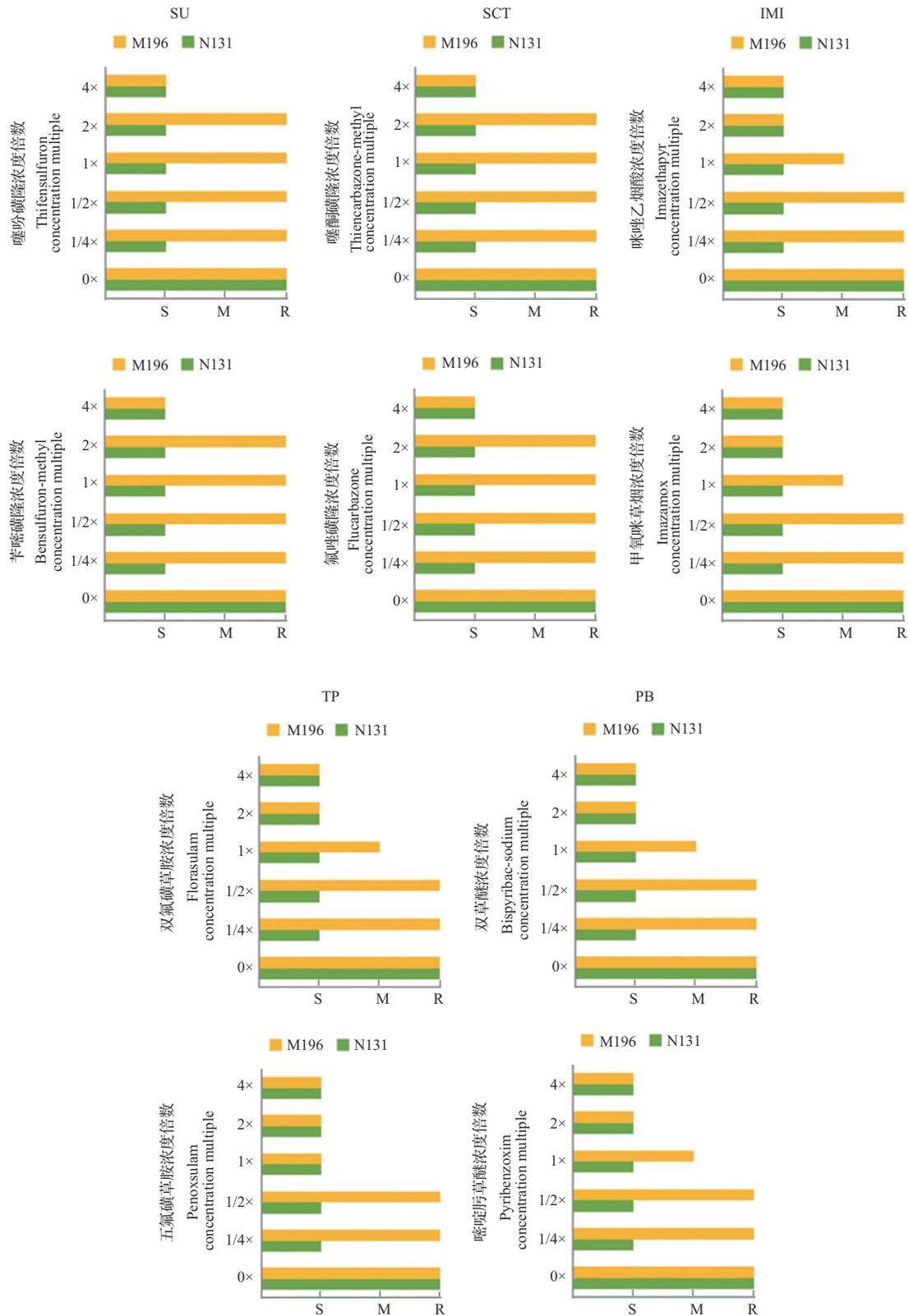
参照 Yoon 等<sup>[18]</sup>方法提取 ALS 粗酶液进行体外酶活试验,以丙酮酸钠为底物,添加浓度梯度 0、1、10、50、100、300、500 和 700 μmol/L 的除草剂标准品(噻吩磺隆、噻酮磺隆、咪唑乙烟酸、双氟磺草胺和双草醚),在波长 530 nm 处测定产物乙偶姻 OD 值,并根据乙偶姻标准曲线计算相应 OD 值处乙偶姻的浓度<sup>[16,19]</sup>,试验包含 3 个生物学及 3 个技术重复。除草剂标准品 99.3% 噻吩磺隆、98% 咪唑乙烟酸、98% 双氟磺草胺、98% 双草醚均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;99.5% 噻酮磺隆购于美国 TMstandard 公司。

结果采用 Microsoft Excel 2007 软件进行分析,Origin 2021 软件进行绘制。酶活计算公式为:相对酶活(%)=处理组乙偶姻浓度/对照组乙偶姻×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 类 ALS 抑制类除草剂交互抗性鉴定

**2.1.1 M196 室内交互抗性** 野生型油菜 N131 在喷施 5 类 ALS 除草剂 3 周后植株均死亡,抗性种质 M196 在喷施 5 类 ALS 除草剂后表现出不同程度的抗性(图 1)。M196 在喷施田间推荐使用浓度的 1/2



S 表示经除草剂处理后植株表现敏感; M 表示经除草剂处理后植株表现中抗; R 表示经除草剂处理后植株表现抗性; 0×、1/4×、1/2×、1×、2× 和 4× 分别表示为 0、1/4、1/2、1、2 和 4 倍田间推荐施用除草剂浓度, 对应国标单位浓度详见表 1; 下同

S indicates that the plants are sensitive to herbicide treatment; M indicates that plants exhibit mid-resistance after herbicide treatment; R indicates plants confer resistance to herbicide treatment; 0×, 1/4×, 1/2×, 1×, 2× and 4× represent 0, 1/4, 1/2, 1, 2 and 4 times the recommended field concentrations, the corresponding national standard unit concentrations are shown in Table 1 in details; The same as below

图 1 M196 和 N131 室内喷施 5 类 ALS 除草剂 3 周后交互抗性鉴定结果

Fig. 1 Cross-resistance evaluation of M196 and N131 by spraying five ALS herbicides after 3 weeks in room

倍及更低剂量的5类除草剂时,植株生长不受影响,表现出较好的抗性;当5类除草剂浓度提升至田间推荐使用浓度的4倍时,植株全部死亡。M196对SU及SCT除草剂具有较高的抗性水平,在喷施田间推荐使用浓度的2倍及以下浓度的2种SU除草剂(噻吩磺隆、苄嘧磺隆)及2种SCT除草剂(噻酮磺隆、氟唑磺隆)时,植株能够正常生长。M196对IMI、PB及TP除草剂的抗性水平基本一致,在喷施田间推荐使用浓度的1/2倍及以下浓度时植株正常生长,未受到抑制;当IMI除草剂(咪唑乙烟酸、甲氧咪草烟)、PB除草剂(双草醚、嘧啶肟草醚)及TP除草剂(双氟磺草胺)浓度提升至田间推荐使用剂量的1倍时,植株部分叶片退绿,生长缓慢,明显受到药害,但并未死亡,而TP除草剂五氟磺草胺田间推荐剂量1倍浓度处理后的植株死亡;当施药浓度提升至田间推荐使用浓度的2倍及以上浓度时,植株均死亡,表现与敏感型油菜一致。综上,油菜抗性种质M196对上述5类ALS除草剂抗性水平存在差异,对SU及SCT除草剂抗性较强,而对IMI、TP和

PB除草剂抗性较弱。

**2.1.2 M196田间交互抗性** 结合油菜抗性种质M196室内交互抗性鉴定结果,分别选用SU除草剂(噻吩磺隆)、SCT除草剂(噻酮磺隆)、IMI除草剂(咪唑乙烟酸)、TP除草剂(双氟磺草胺)、PB除草剂(双草醚)进行喷施处理,设置5个浓度梯度:田间推荐使用浓度的0 $\times$ 、1/4 $\times$ 、1/2 $\times$ 、1 $\times$ 、2 $\times$ (表1)。在喷施除草剂3周后,对油菜表型进行鉴定。野生型油菜N131在喷施1/4倍及以上浓度的除草剂后均死亡,M196则表现出不同程度的交互抗性(图2~3)。结果表明在喷施1/2倍田间推荐使用浓度的各类除草剂后,M196均能够在田间正常生长不受药害影响。在浓度提升至田间推荐使用浓度的1倍时,双草醚、双氟磺草胺及咪唑乙烟酸对M196植株产生药害,植株叶片变紫但植株未死亡;当喷施田间推荐使用浓度的2倍除草剂时,M196对噻吩磺隆及噻酮磺隆表现抗性,喷施其他3类除草剂的植株均死亡。大田试验结果与室内实验结果基本一致,M196对5类除草剂的交互抗性水平并未因环境的改变而受到较大影响。

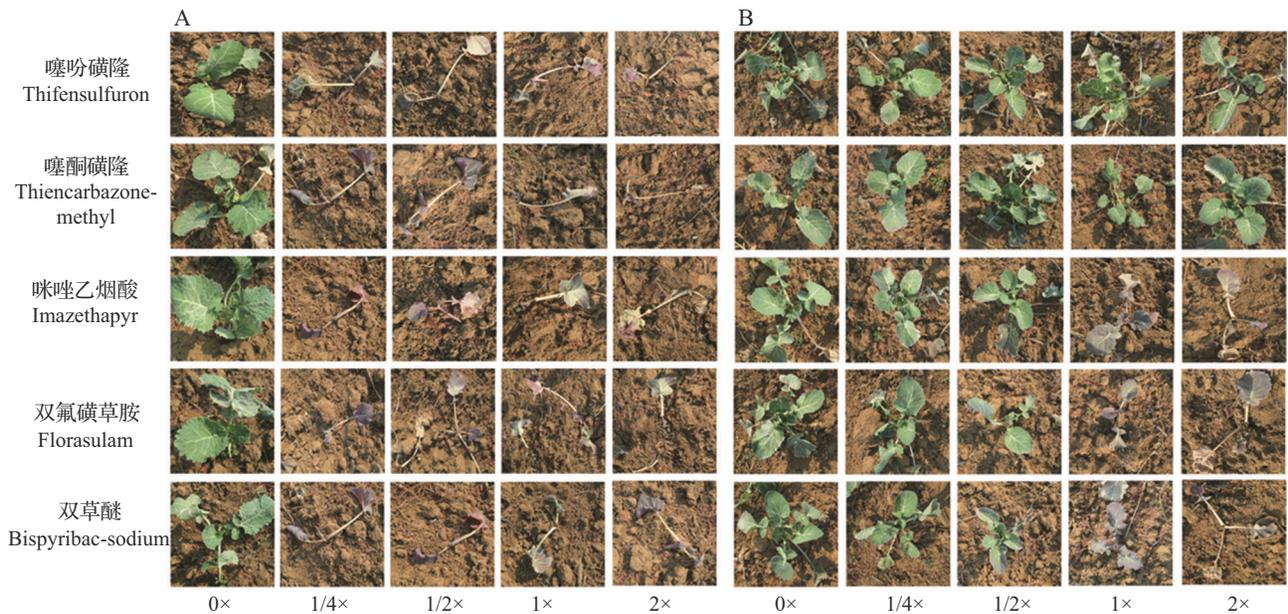


图2 5大类ALS抑制除草剂处理3周后N131(A)和M196(B)田间表型

Fig. 2 Phenotype of N131(A) and M196(B) treated with five ALS-inhibiting herbicides after 3 weeks in field

## 2.2 抗性基因 *BnAHAS1-3R* 的表达分析

为研究油菜抗性种质M196交互抗性的产生与抗性突变基因 *BnAHAS1-3R* 表达量之间的关系,分别取喷施4 $\times$ 各除草剂后0、12、24 h的油菜叶片进行qRT-PCR分析。结果如图4所示,相较于0 h,在喷施5类除草剂24 h时,敏感型油菜N131靶基因表达量均显著下降;而M196靶基因表达量,除SCT除草剂处理组略高(图4B),其余除草剂处理组均下降,但降幅均小于N131,且24 h时M196的表达量均高于N131。对5

类ALS抑制除草剂,M196靶基因表达量的响应程度存在差异。M196对SCT除草剂响应最强(图4B),24 h表达量约为0 h时的1.93倍;其次是SU除草剂(图4A);喷施IMI、PB、TP除草剂24 h时,M196靶基因的表达量相对于12 h显著下降(图4C~E),但表达量仍高于同时时间点的N131。这些结果与上述交互抗性鉴定实验的结果基本一致(图1~3),这说明M196对5类ALS除草剂抗性的产生很有可能与其靶基因表达量的上调存在相关性。

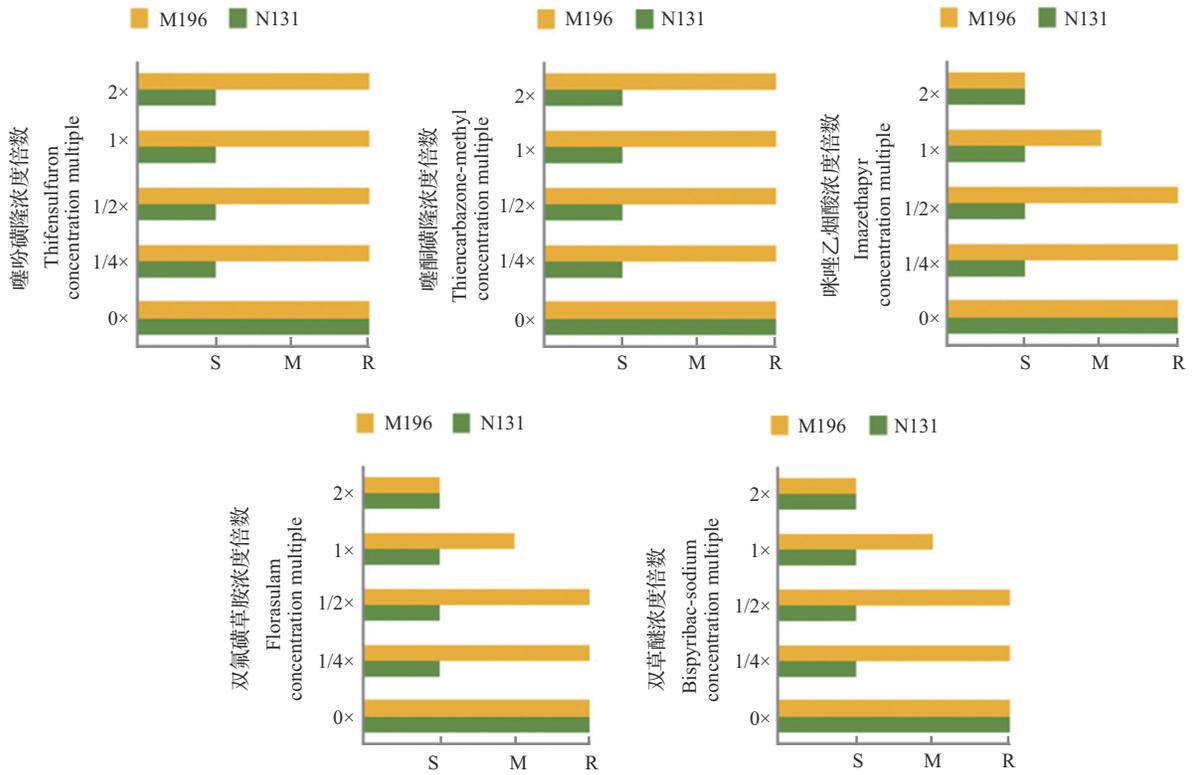
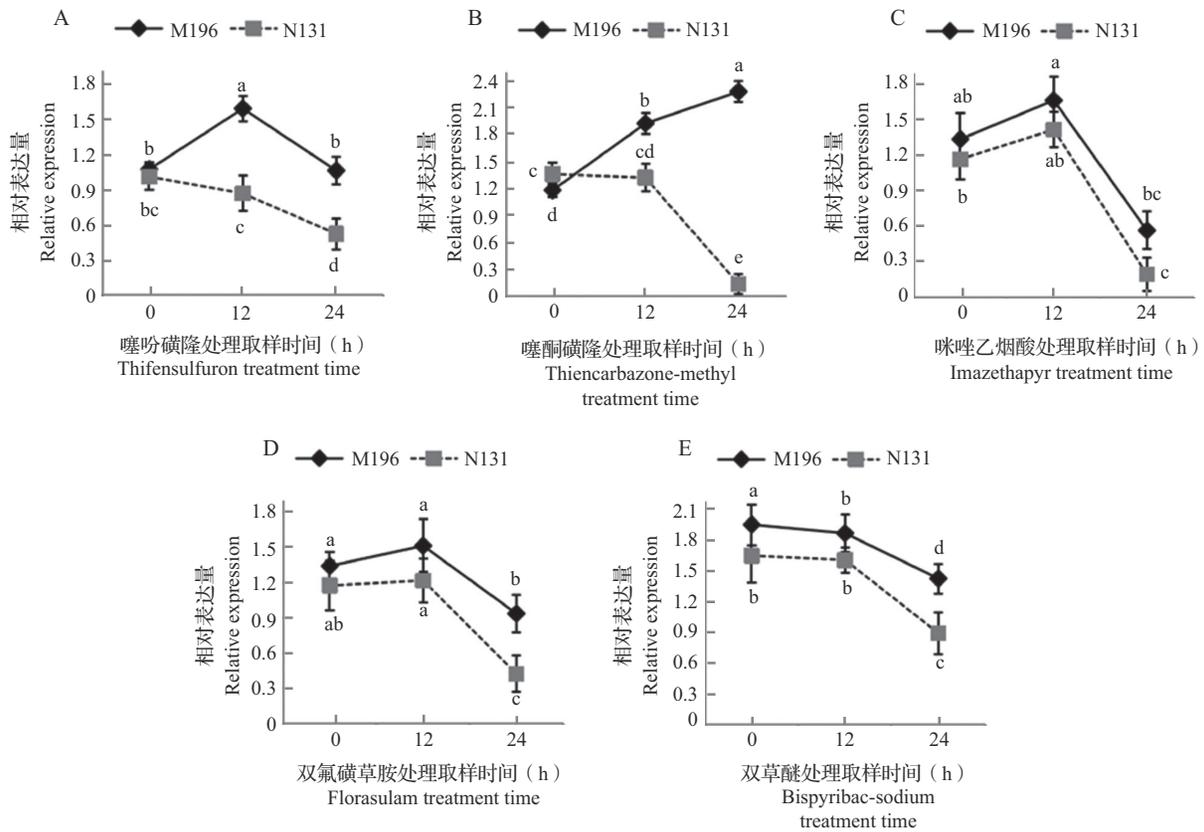


图3 M196和N131田间喷施5类ALS除草剂3周后交互抗性鉴定结果

Fig. 3 Cross-resistance evaluation of M196 and N131 by spraying five ALS herbicides after 3 weeks in field



不同字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ )

Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

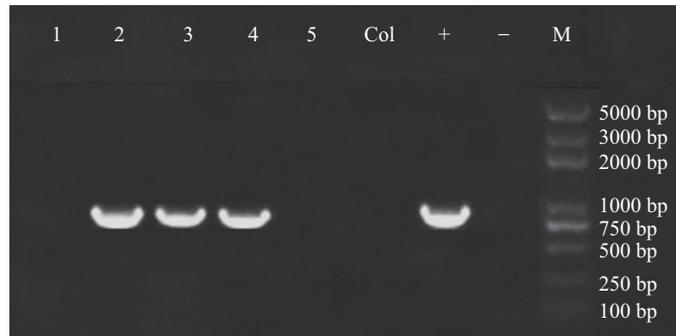
图4 油菜N131及M196 *ALS1* 基因对5类ALS除草剂处理后的表达量响应

Fig. 4 Expression of *ALS1* genes in N131 and M196 after treated with five ALS herbicides

### 2.3 转抗性基因的拟南芥交互抗性鉴定

对获得的纯合转基因株系 T2、T3、T4 进行 PCR 鉴定(图 5),结果表明 T2、T3、T4 的 PCR 产物均可扩增到目的片段。进一步通过交互抗性鉴定验证突变体 M196 中突变基因 *BnAHASI-3R* 的交互抗性功能,野生型拟南芥(Col)在喷施除草剂后株系均死亡,T2、T3、T4 抗性结果如图 6 所示。在喷施田间推荐使用浓度的 1/2× 及以下浓度的除草剂时,转基因

株系均存活,没有受到药害。在喷施田间推荐使用浓度 1× 的除草剂时,转基因株系对 SU 及 SCT 除草剂表现出抗性,而 IMI、PB 及 TP 除草剂处理的株系均死亡。2× 和 4× 浓度处理的所有转基因株系均没有抗性,均死亡。结果与油菜的室内和田间抗性鉴定结果基本一致(图 1~3),所以 M196 中抗性突变基因 *BnAHASI-3R* 具有对 5 类 ALS 抑制除草剂的交互抗性功能。



2、3、4 为纯合株系 T2、T3、T4; 1、5 为转基因阴性株系; Col 为野生型拟南芥,下同; + 为阳性对照质粒; - 为阴性对照纯水; M 为 5000 bp 的 DNA Marker

2, 3, 4 are homozygous plants T2, T3, T4; 1, 5 are transgenic negative plants; Col is wild type of *Arabidopsis*, the same as below; +: Plasmid of positive control; -: Pure water for negative control; M is DNA Marker of 5000 bp

图 5 转基因拟南芥 T2、T3、T4 纯合株系的 PCR 分子鉴定

Fig. 5 PCR molecular identification of T2, T3 and T4 homozygous plants of transgenic *Arabidopsis*

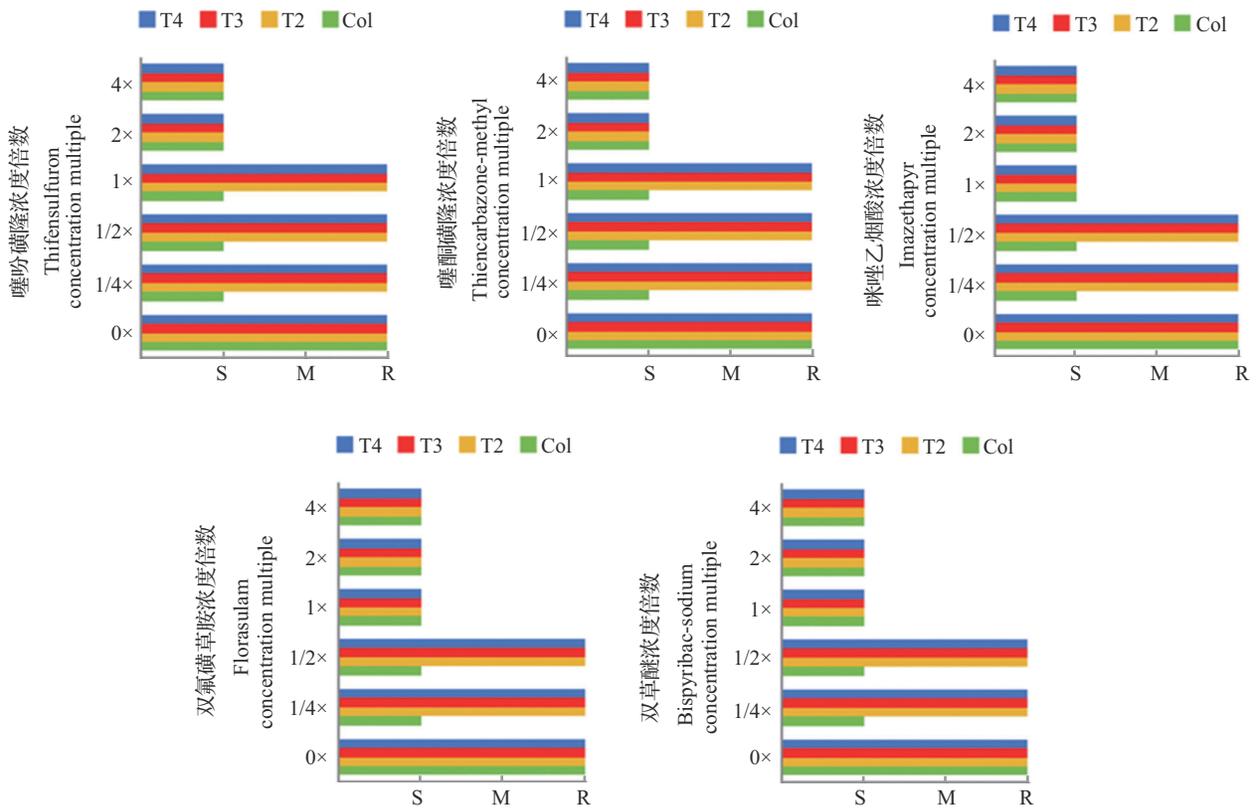


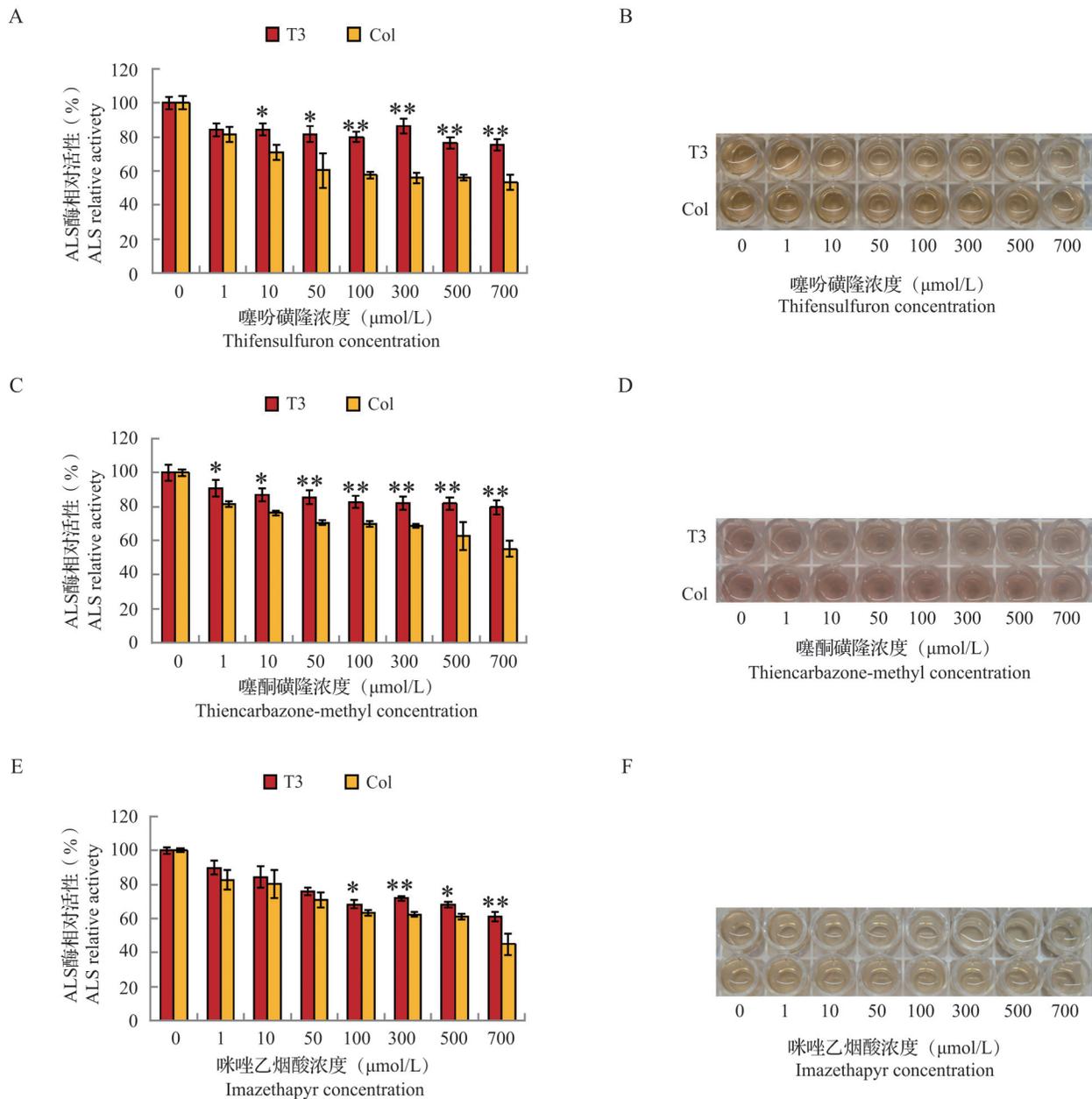
图 6 喷施 5 类 ALS 类除草剂 3 周后转基因拟南芥 T2、T3、T4 交互抗性鉴定

Fig. 6 Cross-resistance identification in transgenic *Arabidopsis* T2, T3 and T4 plants after 3 weeks, by spraying with five ALS herbicides

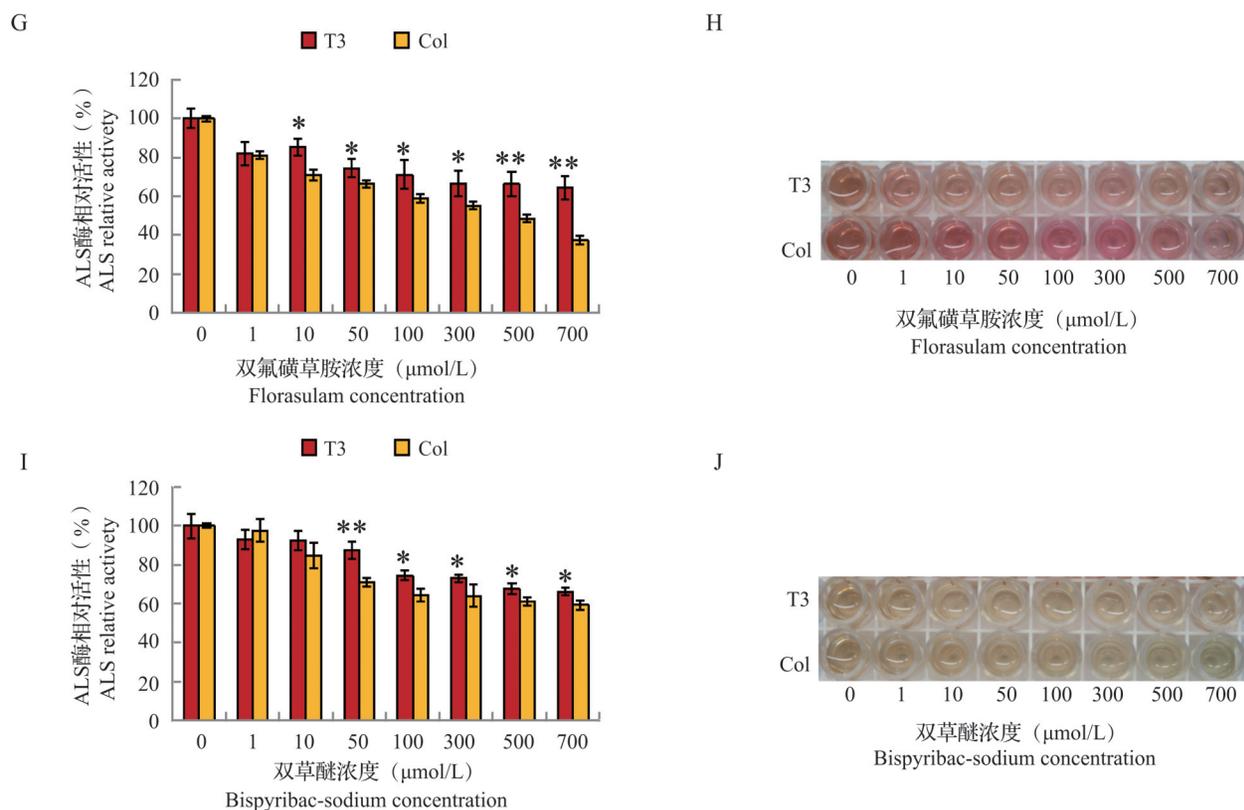
#### 2.4 除草剂处理对转基因拟南芥体外ALS酶活性影响

为了研究转基因拟南芥阳性株系除草剂抗性与ALS酶对各类除草剂的敏感度关系,对野生型拟南芥(Col)和转基因阳性株系T3进行ALS体外酶活抑制试验。从图7中可以看出施加除草剂后,Col及转基因植株的ALS活性都受到了不同程度的影响。使用最高剂量(700  $\mu\text{mol/L}$ )处理后,Col的ALS相对酶活分别为未添加除草剂时的37.24%~59.17%,而T3的ALS相对酶活分别为未加除草剂处理时的61.1%~79.52%,10~700  $\mu\text{mol/L}$  噻吩磺隆、1~700  $\mu\text{mol/L}$  噻酮磺隆、100~700  $\mu\text{mol/L}$  咪唑乙烟酸、

10~700  $\mu\text{mol/L}$  双氟磺草胺、50~700  $\mu\text{mol/L}$  双草醚处理组ALS的酶活性皆显著高于其对应Col的酶活性。从图7中可以看出,转基因株系T3的颜色在相同除草剂处理浓度下,均较Col的颜色浅。丙酮比色实验中反应液颜色会随OD530值升高而颜色逐渐变深,颜色越深可以从一定程度上表明其抗性能力越强。结果表明,转基因植株ALS对SCT类除草剂敏感性最低,其次是SU,再次是TP、PB和IMI。以上结果说明,在拟南芥中过表达抗性基因*BnAHASI-3R*导致其对各大类除草剂的敏感性下降,最终表现出对5类ALS除草剂的交互抗性。



(图7)



5 种 ALS 除草剂(噻吩磺隆、噻酮磺隆、咪唑乙烟酸、双氟磺草胺和双草醚)对野生型拟南芥(Col)和阳性纯合株系 T3 的 ALS 体外酶活性抑制实验(左)和丙酮比色反应(右);\*和\*\*分别表示 Col 和 T3 间差异显著( $t$  检验  $P<0.05$ )和差异极显著( $t$  检验  $P<0.01$ )

In vitro ALS inhibition experiments (left) and acetone colorimetric reaction (right) of wild-type (Col) and positive homozygous T3 plants after treated with five ALS herbicides (Thifensulfuron, Thiencazabone-methyl, Imazethapyr, Florasulam and Bispyribac-sodium); \* and \*\* indicate significant difference between Col and T3 ( $P<0.05$  Student's  $t$ -test) and extremely significant difference ( $P<0.01$  Student's  $t$ -test), respectively

图 7 不同浓度梯度 5 类 ALS 除草剂对拟南芥体外 ALS 酶活性影响

Fig. 7 In vitro ALS activity response to five ALS herbicides with different concentrations in *Arabidopsis* plants

### 3 讨论

除草剂使用是目前田间防治杂草危害最为广泛的手段之一,但农户在生产过程中滥用、乱用的现象屡见不鲜。除草剂的不合理使用会对油菜等作物生产造成减产、品质降低等问题,进而危害其经济效益<sup>[20]</sup>。通过对已有抗性油菜种质的交互抗性研究,补充其抗性谱,可以帮助规范除草剂的用量及喷施种类。此外,筛选对不同类型除草剂具有同等抗性水平的油菜种质,可以实现不同类型除草剂之间的交替使用,降低杂草抗药性产生,进而延长抗性品种的使用寿命。本研究对自主创制的油菜 M196 抗性种质进行 5 类 ALS 除草剂的抗性效应和表达模式研究,结果表明 M196 对 SU 及 SCT 除草剂具有较高水平的抗性,可以进行除草剂之间的交替使用。抗性基因遗传转化拟南芥后,阳性纯合株系交互抗性鉴定得到了与油菜基本一致的结果。抗性基因的表达模式分析与转基因拟南芥的体外

酶活抑制实验表明,ALS 除草剂交互抗性的产生是突变靶基因 *BnAHAS1-3R* 的表达量增加以及突变靶酶对除草剂的敏感性下降导致。目前,本单位利用 M196、M342、DS3 和 5N 等抗性种质中的基因作为抗性供体,已育成宁 R101、宁 R201、惠农油、金地油 1 号和苏 R001 等系列油菜抗性新品种,它们对 SU 抗性水平均达田间推荐使用浓度的 4 倍以上,目前在生产上大面积示范推广应用。

植物对 ALS 除草剂的交互抗性效应与靶标酶突变位点的氨基酸取代突变密切相关。萤蔺草的 ALS 靶蛋白 197 位点脯氨酸被组氨酸或丝氨酸取代时,对苄嘧磺隆和噻吩磺隆(SU)产生抗性,但对 IMI 和 PB 敏感;但当 197 位点脯氨酸被亮氨酸取代时,对 SU 和 PB 产生交互抗性,但对 IMI 敏感<sup>[21]</sup>。野生芥菜 ALS 靶蛋白的 574 位点色氨酸被亮氨酸取代后,对 IMI 和 SU 产生交互抗性<sup>[22]</sup>,播娘蒿 ALS 靶蛋白的 197 位点脯氨酸被组氨酸、丝氨酸、苏氨酸和亮氨酸取代后,对 SU、TP 和 SCT 产生交互抗性,对

IMI 和 PB 敏感; 而播娘蒿的 574 位点色氨酸突变成亮氨酸后, 对 5 类 ALS 抑制剂除草剂均能产生交互抗性<sup>[23]</sup>。前期对自主创制的抗性突变体 PN19 的研究表明, ALS 靶蛋白 574 位点色氨酸突变成亮氨酸后, PN19 对 SU 和 SCT 交互抗性较强, 为推荐除草剂用量的 2 倍左右; IMI 和 TP 其次, 为推荐除草剂用量的 1 倍左右; PB 最低为推荐除草剂用量的 1/2 倍左右<sup>[24]</sup>。而本研究中油菜抗性种质 M196 的 197 位点脯氨酸被亮氨酸取代后, 对 SU 和 SCT 交互抗性最强, 为推荐除草剂用量的 2 倍左右; 而对 IMI、TP 和 PB 的交互抗性较差, 为推荐除草剂用量的 1/2~1 倍左右。此外, PN19 和 M196 都是油菜 *BnAHAS1* 靶基因上发生不同位置的单点突变, 但是在对 ALS 除草剂的各大类型之间产生的交互抗性表型存在较大差异, 此种现象的产生可能是突变位点在靶蛋白的三级结构中的位置差异以及突变前后的氨基酸差异所导致<sup>[8,15]</sup>。

油菜与很多近缘种杂草具有不同程度的天然杂交亲和性, 导致具有除草剂抗性的油菜在种植过程中有可能发生基因漂移<sup>[25]</sup>。这种现象会导致抗性基因在近缘种间流动, 可能诱发生态风险。抗性基因转移至近缘种杂草后, 受体杂草很可能演变为空间内优势种群, 导致植物种群单一以及田间生态脆弱。并且抗性基因进入杂草后, 一旦出现对除草剂的免疫, 变为“超级杂草”, 会严重危害农业生产, 将造成巨大经济损失<sup>[26]</sup>。而通过交互抗性的研究, 可以利用突变基因响应较弱的除草剂种类, 防除发生基因漂移的受体杂草。本研究表明 M196 对 IMI、TP、PB 除草剂抗性水平较低, 可以将喷施这 3 大类除草剂作为解决 *BnAHAS1-3R* 基因漂移问题的有效手段。

#### 参考文献

- [1] 张立伟. 2021 年菜籽菜油菜粕市场分析与 2022 年展望. 粮油与饲料科技, 2022, 187(3): 43-48  
Zhang L W. Market analysis of rapeseed meal in 2021 and outlook in 2022. Grain Oil and Feed Technology, 2022, 187(3): 43-48
- [2] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 300-302  
Wang H Z. Historical review and prospect of the development of rape industry in China. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2010, 32(2): 300-302
- [3] 刘忠松, 官春云, 陈社员. 抗除草剂油菜研究及其进展. 作物研究, 2003, 17(2): 70-72  
Liu Z S, Guan C Y, Chen S Y. Research and progress of herbicide-resistant rapeseed. Crop Research, 2003, 17(2): 70-72
- [4] 管文杰, 张付贵, 闫贵欣, 马启铭, 伍晓明. 油菜抗除草剂机理与种质创制研究进展. 中国油料作物学报, 2021, 43(6): 1159-1173  
Guan W J, Zhang F G, Yan G X, Ma Q M, Wu X M. Research progress of herbicide resistance mechanism and germplasm creation in rapeseed. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(6): 1159-1173
- [5] Zhou Q, Liu W, Zhang Y, Kevin K. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 89(2): 89-96
- [6] Hu M L, Pu H M, Kong L N, Gao J Q, Long W H, Chen S. Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production. Molecular Breeding, 2015, 35(1): 1-13
- [7] Guo Y, Cheng L, Long W H, Gao J Q, Zhang J F, Chen S. Synergistic mutations of two rapeseed *AHAS* genes confer high resistance to sulfonyleurea herbicides for weed control. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(10): 2811-2824
- [8] Powles S B, Preston C. Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants. Australia: Herbicide Resistance Action Committee, 2016
- [9] 毕亚玲. 小麦田日本看麦娘对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆的抗性研究. 泰安: 山东农业大学, 2014  
Bi Y L. Resistance of *Alopecurus japonicas* to fenxaprop-ethyl and mesosulfuron-methyl in winter wheat fields. Taian: Shandong Agricultural University, 2014
- [10] 吴元龙, 惠凤娇, 潘振远. 后基因组时代发展抗除草剂作物的机遇及挑战. 中国农业科学, 2023, 56(17): 3285-3301  
Wu Y L, Hui F J, Pan Z Y. Opportunities and challenges for developing herbicide-resistance crops in the post-genomic era. Science Agricultural Sinica, 2023, 56(17): 3285-3301
- [11] Chen L, Gu G, Wang C X, Chen Z F, Yan W, Jin M, Xie G, Zhou J L, Deng W X. Trp<sub>548</sub>Met mutation of acetolactate synthase in rice confers resistance to a broad spectrum of ALS-inhibiting herbicides. The Crop Journal, 2021, 9: 750-758
- [12] Li H T, Li J J, Zhao B, Wang J, Yi L C, Liu C, Wu J S, King Graham, Liu kede. Generation and characterization of tribenuron-methyl herbicide-resistant rapeseed (*Brassica napus*) for hybrid seed production using chemically induced male sterility. The Original and Applied Genetics, 2015, 128: 107-118
- [13] Barrell P J, Latimer J M, Baldwin S J, Thompson M L, Jacobs J M E, Conner A J. Somatic cell selection for chlorsulfuron-resistant mutants in potato: Identification of point mutations in the acetohydroxyacid synthase gene. BMC Biotechnology, 2017, 17: 49
- [14] Hu M L, Pu H M, Gao J Q, Long W H, Chen F, Zhou X Y, Zhang W, Peng Q, Chen S, Zhang J F. Inheritance and molecular characterization of resistance to AHAS-inhibiting herbicides in rapeseed. Journal of Integrative Agriculture,

- 2017, 16(11): 2421-2433
- [15] Guo Y, Liu C, Long W H, Ghao J Q, Zhang J F, Chen S, Pu H M, Hu M L. Development and molecular analysis of a novel acetohydroxyacid synthase rapeseed mutant with high resistance to sulfonylurea herbicides. *The Crop Journal*, 2022, 10(1): 56-66
- [16] Guo Y, Wang T, Lu X, Li W, LV X, Peng Q, Zhang J, Gao J, Hu M. Comparative genome-wide analysis of circular RNAs in *Brassica napus* L.: Target-site versus non-target-site resistance to herbicide stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(7): 176
- [17] 刘长乐. 抗嘧啶水杨酸类除草剂油菜抗性遗传与分子机制研究. 镇江: 江苏大学, 2023
- Liu C L. Genetic and molecular mechanism of new resistance mutation with pyrimidinyl carboxy herbicide in rapeseed. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023
- [18] Yoon T Y, Chung S M, Chang S I. Roles of Iysine 219 and 255 residues in tobacco acetolactate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293 (1) : 433-439
- [19] 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 of the United States of America*, 2017, 114(7): E1091-E1100
- [20] 王隆都. 闽中稻区除草剂应用现状与安全用药对策. *杂草科学*, 2012, 30(3): 64-66
- Wang L D. Application status of herbicide and safe drug use countermeasures in Minzhong rice area. *Weed Science*, 2012, 30(3): 64-66
- [21] Akira U, Ogata S, Kohara H, Yoshida S, Yoshioka, Watanabe H. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biology and Management*, 2007, 7, 89-96
- [22] Christoffers M J, Nandula V K, Howatt K A, Wehking T R. Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Weed Science*, 2006, 54 (2) : 191-197
- [23] 邓维. 抗苯磺隆播娘蒿抗性机理及抗性突变对乙酰乳酸合成酶功能影响. 北京: 中国农业大学, 2017
- Deng W. The resistance mechanisms of tribenuron-methyl-resistant fixweed (*Descurainia sophia* L.) and effects of resistance-endowing mutations on ALS functionality. Beijing: China Agricultural University, 2017
- [24] 郭月, 卢鑫宇, 王婷, 李伟龙, 祁余容, 吕欣蕾, 彭琦, 高建芹, 张洁夫, 胡茂龙. 油菜抗除草剂新种质PN19的交互抗性鉴定及其抗性基因的表达研究. *中国油料作物学报*, 2023, 45(6): 1206-1216
- Guo Y, Lu X Y, Wang T, Li W L, Qi Y R, Lv X L, Peng Q, Gao J Q, Zhang J F, Hu M L. Cross-resistance of herbicide resistant novel germplasm PN19 in rapeseed and study on expression of resistance gene. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 45(6): 1206-1216
- [25] Hu D D, Jing J J, Snowdon R J, Annaliese S, Mason, Shen J L, Meng Y L, Zou J. Exploring the gene pool of *Brassica napus* by genomics-based approaches. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9): 1693-1712
- [26] 咸志慧, 龙卫华, 浦惠明, 胡茂龙, 高建芹. 抗除草剂油菜生态风险的研究进展. *中国油料作物学报*, 2023, 45(6): 1197-1205
- Xian Z H, Long W H, Pu H M, Hu M L, Gao J Q. Research progress on ecological risk of herbicide-resistant rapeseed. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 45(6): 1197-1205