

抗 ALS 类除草剂作物种质创制与利用研究进展

刘长乐^{1,2}, 郭月^{2,3}, 李芳芳², 袁自成^{2,4}, 龙卫华^{1,2}, 浦惠明², 胡茂龙^{1,2,4,5}
(¹江苏大学生命科学学院, 镇江 212023; ²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/江苏省现代作物生产协同创新中心,
南京 210014; ³江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; ⁴南京农业大学农学院/作物遗传与
种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ⁵福建农林大学作物科学学院, 福州 350002)

摘要: 农田杂草是影响作物品质和产量的主要因素, 而化学除草是现代农业生产中杂草控制的主要手段。乙酰乳酸合酶 (ALS, acetolactate synthase) 也称乙酰羟乙酸合酶 (Acetohydroxyacid synthase), 是植物支链氨基酸生物合成第一步的催化酶。ALS 抑制剂类除草剂也称 ALS 类除草剂, 其通过干扰 ALS 与底物结合来抑制植物支链氨基酸的生物合成, 从而达到灭杀杂草的目的。随着 ALS 类除草剂在农业生产上的广泛应用, 除草剂残留对后茬作物的伤害问题日益严重, 对作物产量和品质的影响也尤为明显。因此, 创制和培育 ALS 抑制剂类作物种质, 是充分利用此类除草剂进行杂草防控的有效途径之一。通过化学诱变和自然突变的方法已在多种作物中创制出对 ALS 类除草剂具有抗性的种质, 并成功培育出抗性品种。本文从 ALS 类除草剂的特性、种类和适用范围, 抗 ALS 类除草剂作物的抗性机制, 抗 ALS 类除草剂的作物种质创制和利用研究进展等方面进行了综述, 以期作为作物抗 ALS 类除草剂种质创新和品种选育提供参考, 并对未来抗 ALS 类除草剂作物的可能发展作出简单预测。

关键词: 乙酰乳酸合酶; ALS 类除草剂; 作物; 种质创制

Advances in Development and Utilization of Crop Germplasm Resources Resistant to ALS Herbicides

LIU Chang-le^{1,2}, GUO Yue^{2,3}, LI Fang-fang², YUAN Zi-cheng^{2,4},
LONG Wei-hua^{1,2}, PU Hui-ming², HU Mao-long^{1,2,4,5}

(¹School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212023; ²Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Nanjing Subcenter, National Center of Oil Crops Improvement/Key Laboratory of Cotton and Rapeseed (Nanjing), Ministry of Agriculture/Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210014; ³School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; ⁴College of Agriculture, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095; ⁵College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: Field weeds are the main factors affecting crop quality and yield, and chemical weed control is the primary strategy in modern agricultural production. Acetolactate synthase (ALS), also known as acetohydroxyacid synthase, is the critical enzyme in the biosynthesis of branched amino acids in plants. ALS inhibitor herbicides are also called ALS herbicides, which inhibit the biosynthesis of branched-chain amino acids in plants by disturbing the binding of ALS to substrates, achieving the purpose of killing weeds. With

收稿日期: 2021-12-15 修回日期: 2022-01-12 网络出版日期: 2021-12-20

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211215001>

第一作者研究方向为油菜遗传育种, E-mail: liuchangle0323@163.com

通信作者: 胡茂龙, 研究方向为油菜遗传与分子育种研究, E-mail: humolon@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31870519, 31901503); 国家油菜产业技术体系 (CARS-12); 江苏省自然科学基金 (BK20190267)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31870519, 31901503), China Agriculture Research System (CARS-12), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20190267)

the widespread application of ALS herbicides in agricultural production, the problem of herbicide residues on subsequent crops is becoming more and more serious. The impact on crop yield and quality is particularly obvious. Thus, breeding for cultivars resistant to these herbicides would bring great advantage in effective weed control. Germplasm resistant to ALS herbicides has been created in a variety of crops through chemical mutagenesis and natural mutation, and resistant varieties have been successfully developed. In this study, the characteristics, types and scope of application for ALS herbicides, the resistance mechanism of ALS herbicide-resistant crops, and the research progress of germplasm creation and utilization of ALS herbicide-resistant crops were reviewed, which provides a better understanding of crops resistant to ALS herbicides. The innovation of herbicide germplasm and variety selection can provide reference, and make a simple prediction for the possible development of ALS-resistant herbicide crops in the future.

Key words: acetolactate synthase; ALS herbicides; crop; development of germplasms

世界人口的不断增长和环境问题的日趋严峻,使得农作物产量的提高变得尤为重要。而农田杂草是影响作物产量和品质的重要因素,因杂草与作物竞争水、肥、气、热和空间,每年导致全球作物34%以上的产量损失^[1]。此外,杂草还会通过影响油菜根部通透性来增加湿度,进而增加油菜病害的发生和传播^[2]。人工除草可有效减少杂草危害,但这种方式耗时费力、效率低下,不符合现代农业生产需求。在过去的几十年里,化学除草作为防控草害的主要手段,因操作简便经济有效而被广泛应用。

乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)抑制剂类除草剂因具有广谱性、活性高、选择性强和生物安全性高等特点而备受青睐。其主要包括5个不同结构的化合物家族,分别是咪唑啉酮类(IMI, imidazolinones)、磺酰脲类(SU, sulfonyleureas)、三唑啉磺酰胺类(TP, triazolopyrimidines)、嘧啶水杨酸类(PB, pyrimidyl-benzoates)和磺酰氨基三唑啉酮类(SCT, sulfonlyaminocarbonyl-triazolinones)^[3]。其中IMI类主要品种有咪唑乙烟酸(Imazethapyr)和甲氧咪草烟(Imazamox),咪唑乙烟酸主要用于大豆田防除一年生杂草,如稗草(*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv.)、苘麻(*Abutilon theophrasti* Medik.)和反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.)等;甲氧咪草烟主要用于大豆田防除一年生杂草。SU类对阔叶杂草有特效,种类较多,主要有苯磺隆(Tribenuron-methyl)、噻吩磺隆(Thifensulfuron methyl)、酰嘧磺隆(Amidosulfuron)、苄嘧磺隆(Bensulfuron methyl)、氟嘧磺隆(Primisulfuron-methyl)、氟磺隆(Prosulfuron)等商品,苯磺隆用于麦类田防除一年生或多年生阔叶杂草,如播娘蒿(*Descurainia*

sophia (L.) Webb. ex Prantl)、荠菜(*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.)等;噻吩磺隆用于麦类和玉米田防除阔叶杂草,如播娘蒿、荠菜、猪殃殃(*Galium spurium* L.)、婆婆纳(*Veronica polita* Fr.)等;酰嘧磺隆用于麦类田防除阔叶杂草,对猪殃殃有特效;氟嘧磺隆用于玉米田防除一年生或多年生杂草,如稗草、荠菜等;苄嘧磺隆主要用于稻田防除一年生和多年生阔叶杂草和莎草,对鸭舌草(*Monochoria vaginalis* (Burm.f.) C. Presl)、异型莎草(*Cyperus difformis* L.)等效果良好;氟磺隆用于玉米田防除禾本科和阔叶杂草。TP类现存品种应用较多的有五氟磺草胺(Penoxsulam)、双氟磺草胺(Florasulam)和唑嘧磺草胺(Plumetsulam),其中五氟磺草胺用于稻田防除稗草、千金子(*Leptochloa chinensis* (L.) Nees)以及一年生莎草科和阔叶杂草;双氟磺草胺主要用于冬小麦田防除阔叶杂草;唑嘧磺草胺用于玉米和大豆田防除阔叶杂草。PB类现有品种有双草醚(Bispyribac-sodium)、嘧啶肟草醚(Pyribenzoxim)和嘧硫草醚(Pyriithiobac-sodium)等,其中双草醚主要用于直播水稻田防除一年生和多年生杂草,特别对3~6叶期的稗草有特效,对碎米莎草(*Cyperus iria* L.)、千金子等效果优异;嘧啶肟草醚是广谱水稻田除草剂,主要用于防除多数禾本科和阔叶杂草,对双穗雀稗(*Paspalum paspaloides* (Michx.) Scribn.)效果较好;嘧硫草醚主要用于棉花田防除一年生和多年生禾本科杂草和多数阔叶杂草。SCT类主要品种有噻酮磺隆(Thiencarbazone-methyl)和氟唑磺隆(Flucarbazone)等,其中噻酮磺隆可有效防除玉米田禾本科杂草和阔叶杂草;氟唑磺隆适用于小麦田对野燕麦(*Avena fatua* L.)和看麦娘(*Alopecurus aequalis* Sobol.)等禾本科杂草和部分阔叶杂草的防

除。尽管 ALS 类除草剂有诸多优点,但其不足之处是其作用位点相对单一,若长期、高频和大面积地使用,较易产生杂草抗药性,通常 3~6 年就会出现抗性种群。因此,多途径、多手段持续不断开发新型 ALS 类除草剂抗性种质、挖掘抗性基因是解决抗性杂草问题的有效途径之一。本文将从以下几方面分析国内外研究现状,着重介绍有关 ALS 类除草剂抗性种质资源创制和利用的研究进展,以期给抗除草剂作物种质创制和抗性品种选育提供一定的理论参考。

1 ALS 及除草剂抗性机制

ALS 抑制剂类除草剂的作用靶标是 ALS,除草剂与 ALS 的底物结构几乎不存在相似性,是通过阻断底物进入酶的活性位点与之结合,进而抑制支链氨基酸的生物合成,破坏生物体内的蛋白代谢活动,最终灭杀杂草^[4]。ALS 是一种生物合酶,由分子量 60~70 kDa 的催化亚基和分子量 9.5~54 kDa 的调节性亚基组成,能够指导合成支链氨基酸,存在于所有的高等植物、真菌和细菌中,但不存在于动物体内^[5]。ALS 催化两个平行反应,即催化两分子丙酮酸合成 (R)-乙酰乳酸(AL, acetolactate) 释放出 CO₂, 最终生成缬氨酸和亮氨酸; 催化一分子丙酮酸和一分子 2-酮丁酸合成 (R)-乙酰羟丁酸酯 (AHB, aceto-hydroxy-butyrate) 最终生成异亮氨酸,其比例仅取决于介质中两种底物的浓度^[6-7]。催化反应也需要一些辅因子,如硫胺素二磷酸(ThDP, thiamine diphosphate)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD, flavin adenine dinucleotide)和二价金属离子如镁、锰等。

植物对 ALS 类除草剂产生抗性的机制主要有 2 种: 一是靶标抗性 (TSR, target-site resistance), 即靶标基因关键位点发生突变, 对应靶标酶对除草剂的敏感性下降, 产生抗性; 二是非靶标抗性 (NTSR, non-target-site resistance), 即不涉及靶基因位点突变, 但仍能使植物在施用除草剂后存活, 潜在的机制包括减少除草剂的吸收、转运和活化, 增强除草剂解毒和诱导损伤的修复能力等^[8]。根据模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) ALS 基因的相应氨基酸序列计算 (下同), TSR 涉及的氨基酸突变位点是下列中的一个或多个, 即 Ala122、Pro197、Ala205、Asp376、Trp574、Ser653 以及 Gly654^[9], 其中报道最多的是 Pro197 和 Trp574

氨基酸突变。并且, 除草剂的抗性种类和抗性效应是由 ALS 氨基酸突变位点和种类决定的。例如, Ala-122-Tyr/Val 氨基酸突变对 SU 类和 TP 类除草剂具有高抗性, 但对 IMI 类除草剂具有低抗性, 而 Ala-122-Thr 氨基酸突变却仅对 IMI 类除草剂具有高抗性^[10]; Pro197 突变为 Ala、Arg、Gln、His、Ser、Tyr 等氨基酸中的任何一种都会对 SU 类和 TP 类除草剂表现出较高抗性, 但突变为 Leu 时, 还会变为对 IMI 类除草剂有抗性。Ser653 氨基酸突变对 IMI 类除草剂具有高抗性, Trp574 氨基酸突变对 SU 类、IMI 类和 TP 类除草剂都具有高水平抗性, 而 Ala205 氨基酸突变提供了对所有 ALS 类除草剂的抗性^[11]。由此可见, 靶标抗性取决于 ALS 上氨基酸替换发生的位点及其位点处替换氨基酸的种类, 不同位点变异对 ALS 类除草剂存在复杂的交互抗性。与靶标抗性相比, 非靶标抗性可能仅限于几种作用模式相同的除草剂^[8]。阔叶植物中很少报道非靶标抗性对 ALS 类除草剂的抗性, 但有研究发现, 具有相同 ALS 基因型的虞美人 (*Papaver rhoeas* L.) 植株对 ALS 类除草剂的敏感性存在差异, 并且在携带突变 ALS 等位基因的群体中发现对 ALS 类除草剂具有抗性的植物, 这种情况被认为是非靶标抗性^[12]。Scarabel 等^[13]用对 IMI 类除草剂具有非靶标抗性的虞美人作为亲本, F₁ 出现对 SU 类除草剂的抗性, F₂ 出现对 TP 类除草剂的抗性, 这种抗性由多基因控制, 在单株中通过多代基因座的积累逐渐形成, 具有个体效应, 并且 ALS 抗性等位基因可以和非靶标抗性基因共存。目前, 非靶标抗性主要涉及植物的代谢解毒能力, 抗性可能涉及许多过程, 但最为人所知的是 3 组同工酶 (细胞色素 P450 单氧化酶、谷胱甘肽转移酶和糖基转移酶) 的变化和 ATP 结合转运蛋白的变化^[14]。如何严格区分是单纯的非靶标抗性还是因靶标抗性存在而诱发的非靶标抗性是一个难题, 所以非靶标抗性植物对 ALS 类除草剂耐受性调控具体的分子机制还需要进一步探索。

现今, 研发一种新型除草剂变得越来越难, 找到一种具有新颖作用方式的除草剂更难^[15]。鉴于此, 通过遗传手段增加作物抗性进而扩大现有环境友好型除草剂的使用范围, 是解决杂草抗药性的一种有效策略。近年来, 由 ALS 突变获得除草剂抗性作物种质得到广泛研究, 下面将对主要粮食和油料作物的 ALS 类除草剂抗性种质创制与育种利用进行详细介绍。

2 粮食作物的抗性种质创制与育种利用

2.1 水稻

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全世界最重要的粮食作物之一。近年来,水稻生产由移栽向直播转变,加重了杂草(尤其是杂草稻)的危害^[16]。杂草稻具有很强的竞争性,影响水稻的生长并导致其减产。因其分类和遗传学上与栽培稻亲缘关系密切,很难开发出专门的除草剂对其进行有效防除^[17-18]。对于稻田杂草稻,IMI类除草剂具有良好的防效,但普通栽培稻对其敏感不能使用。创制抗性种质,培育抗性品种,可以解决这一困境。研究人员利用甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methanesulfonate)诱变水稻品种AS3510种子,咪唑乙烟酸喷施M₂植株,筛选出存活植株,经鉴定该植株后代对几种ALS类除草剂(IMI类、SU类和PB类)有交互抗性^[19],该突变体为93AS3510。随后利用该突变体开发出两种抗IMI类除草剂的水稻品种CL121和CL141,于2001年在美国首次销售^[20]。对水稻品种Cypress也使用同样的方法处理,于3叶期施用药140 g a.i./hm²甲基咪草烟得到12株存活后代,选择其中7个耐受性最强的品系PWC16、PWC23、CMC29、CMC31、WDC33、WDC37和WDC38进一步研究抗性表现^[19]。之后用此来源的抗性材料开发了两个抗IMI类除草剂的水稻品种CL161和XL8,并于2003年首次投放美国市场^[21]。DNA测序表明,93AS3510和PWC16突变体的ALS基因均为单碱基突变,导致对除草剂出现抗性,其中93AS3510的突变是Gly654Glu,而PWC16的突变是Ser653Asn, PWC23、CMC29、WDC33和WDC38的突变位点与PWC16相同^[22]。Shoba等^[23]通过对旱稻(N22, Nagina22)种子进行EMS诱变,在M₂植株中鉴定出3株抗性突变体,随后通过2.5 mL/L的咪唑乙烟酸筛选处理,最终发现1个由单基因控制的耐IMI类除草剂水稻株系HTM-N22,其抗性可能是由Gly178Glu突变导致,但尚未开发出商业化品种。

中国研究人员对水稻品种9311种子进行EMS诱变和除草剂筛选,得到优良粳稻矮秆品种JD164,并鉴定出该突变与PWC16材料的突变位点一致,使其对IMI类除草剂具有专一耐受性,对咪唑乙烟酸的抗性浓度为500 mg/L^[24]。通过津稻9618和津稻1007杂交以及多年系谱法选育得到抗IMI的金粳818,推测可能是水稻与大豆轮作田中发生的天然突变体,经鉴定该突变与PWC16的突变位点

一致,对咪唑乙烟酸的抗性浓度达70 g/hm²^[25]。金粳818在中国河南沿黄、山东南部、江苏淮北、安徽沿淮及淮北等地区种植。Chen等^[26]对籼稻黄华占进行EMS诱变,在M₂施用108 g a.i./hm²的甲基咪草烟进行筛选,经过3代回交和除草剂筛选,最终获得具有稳定除草剂抗性的品种JTD-001。序列比对发现,JTD-001中ALS基因1642~1643位碱基TG变为AT,导致Trp574Met氨基酸突变。毕俊国等^[27]通过对水稻种质资源使用5%有效成分的咪唑乙烟酸筛选,获得1份抗性种质R16-4。经鉴定该突变与PWC16的突变位点一致,抗性浓度为1500 mL/hm²。

水稻中也有少量PB类除草剂抗性种质的研究报道。以PB类除草剂双草醚为筛选剂,研究人员从愈伤组织中筛选获得2个抗性品系,经鉴定为ATG后第284位核苷酸发生突变(G/C),导致对应的甘氨酸被丙氨酸取代(G95A,对应的拟南芥ALS氨基酸顺序为G121A),植株对PB类除草剂产生抗性。ALS-G95A基因可用作水稻的选择标记基因,也可以结合不同类型的ALS突变来创制交互抗性作物^[28]。Kawai等^[29]对水稻细胞与双草醚共培养获得自发突变的抗性细胞,经鉴定发现ALS基因发生双突变,导致氨基酸序列发生W574L/S653I的突变,产生对多种ALS类除草剂的交互抗性,其中对PB类除草剂具有最强的耐受性(1 kg a.i./hm²)。以上水稻抗性种质的主要信息详见表1。

2.2 玉米

玉米 (*Zea mays* L.) 是全世界总产量最高的作物。生产上应用的ALS类除草剂有烟嘧磺隆等,由于用量、种类等问题,经常会对玉米造成伤害,且近年来抗性杂草问题尤其是恶性杂草反枝苋愈发严重。因此,创制其他类型的ALS抗性种质,对于玉米育种与生产至关重要。

抗ALS类除草剂玉米的创制始于1982年,研究人员通过在含IMI的培养基共培养玉米杂种A188×B73的愈伤组织中筛选出8种耐IMI品系:XA17、XI12、QJ22、XS40、ZA54、UV18、AC17和QT15。随后XA17和XI12抗性被引入到商业化玉米品种中,于1992年在美国分别育成抗性玉米IR2和IMI3^[30-32]。之后,通过EMS诱变自交系玉米UE95的花粉,成功获得包括突变体1和突变体2在内的几种IMI耐受的玉米自交系,这种抗性来源也被应用于商业化抗性玉米品种的选育和利用^[30,33]。XA17和XI12是ALS2基因突变的抗性

表 1 水稻 *ALS* 基因的抗性突变体Table 1 Resistant mutants gained from mutations of the *ALS* gene in rice

特性 Character	93AS3510	PWC16	HTM-N22	JD164	JTD-001	金粳 818 Jinjing 818	抗性品系 Resistant line	R16-4	抗性水稻细胞 Resistant rice cell
核苷酸变化 Nucleotide change	无数据	无数据	无数据	G/A	TG/AT	G/A	G/C	G/A	无数据
氨基酸变化 Amino-acids change	G654E	S653N	G178E	S653N	W574M	S653N	G121A	S653N	W574L/S653I
创制手段 Development method	种子诱变	种子诱变	种子诱变	种子诱变	种子诱变	自然突变	花药培养	无数据	细胞培养
除草剂抗性 Herbicide resistance	交互抗性	IMI	IMI	IMI	IMI	IMI	交互抗性	IMI	交互抗性

交互抗性是指突变体对 2 种以上的 ALS 类除草剂具有抗性,下同

Cross resistance means that the mutant has resistance to more than two ALS herbicides, the same as below

材料,而 QJ22 和 XS40 则是 *ALS1* 基因突变的抗性品系。通过基因测序发现, XI12 的基因突变导致 Ser653Asn 位的氨基酸替代, QJ22 和突变体 2 都具有相同的 Ser653Asn 突变位点,对 IMI 类除草剂抗性为 30 倍(相对于野生型,下同)^[34-35]。与 XA17 在同一个基因上的 Trp574Leu 突变,能对 ALS 类除草剂(IMI、SU、TP、PB)产生交互抗性,其中对 IMI

类除草剂的抗性是 300 倍,对 SU 类除草剂的抗性是 1000 倍以上^[32-34, 36-38]。突变体 1 的 Ala122Thr 突变,仅能对 IMI 类除草剂产生耐受性^[3]。除上述突变体外,玉米中也存在非典型突变品种 ICI 8532 IT,其突变为 Ala155Thr,对 IMI 类和 PB 类除草剂产生抗性, I_{50} 分别是野生型的 7 倍和 5 倍^[33]。以上玉米抗性种质的主要信息详见表 2。

表 2 玉米 *ALS* 基因的抗性突变体Table 2 Resistant mutants gained from mutations of the *ALS* gene in maize

特性 Character	XA17	XI12	QJ22	突变体 1 Mutant 1	突变体 2 Mutant 2	ICI 8532 IT
核苷酸变化 Nucleotide change	无数据	无数据	无数据	无数据	无数据	无数据
氨基酸变化 Amino-acids change	W574L	S653N	S653N	A122T	S653N	A155T
创制手段 Development method	组织培养	组织培养	组织培养	花粉诱变	花粉诱变	花粉诱变
除草剂抗性 Herbicide resistance	交互抗性	IMI	IMI	IMI	IMI	IMI、PB

2.3 小麦

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是重要的粮食作物之一。小麦田受恶性杂草特别是节节麦的影响严重,二者的关系类似于水稻和杂草稻,目前并没有专门用于防除节节麦的除草剂。小麦田用于杂草防除的 ALS 类除草剂有 IMI、SU 和 TP 类除草剂。国外研究人员利用叠氮化钠 (Sodium azide) 诱变法国冬小麦 Fidel,并用 300 g a.i./hm² 的咪唑乙烟酸筛选获得了 4 株抗性植株: FS1、FS2、FS3 和 FS4^[39]。随后,这 4 株抗性植株被用作培育抗 IMI 类除草剂小麦品种的供体,并于 2002 年在美国商业化

种植^[40]。通过 EMS 诱变春小麦 Teal,并用 40 g a.i./hm² 甲氧咪草烟喷施 M₂ 植株,筛选得到 6 种抗性品系,被称为 TealIMI 品系 1A、9A、10A、11A、15A 和 16A。进一步研究发现,1A、9A、10A 和 16A 的抗性基因以及 15A 的 1 个抗性基因与 FS-4 是等位基因 (*ALSL-D1*),被命名为 *Imi1*, 11A 存在的抗性基因 (*ALSL-B1*),被命名为 *Imi2*, 序列鉴定 *Imi1* 和 *Imi2* 基因的突变都是 Ser653Asn 氨基酸替换, 15A 的第 2 个抗性基因被命名为 *Imi3*, 多个抗性基因组成的基因型可以提高小麦对 IMI 类除草剂的抗性^[40], 这些 TealIMI 品系育成的小麦抗性品种在 2000 年

后以商品名 Clearfield 出售^[41]。通过对澳大利亚小麦品种 Brookton 使用叠氮化钠进行诱变,以 400 mg/L 的甲基咪草烟 (Imazapic) 和灭草烟 (Imazapyr) 复合组合处理,最终获得 Brookton-8 突变体, DNA 序列比对发现 Brookton-8 突变体的 6D 染色体 *ALS* 基因上有鸟嘌呤到腺嘌呤的突变,导致 Ala122 Thr 氨基酸突变,进而对 IMI 类除草剂产生更强的耐受性^[42]。然而,中国关于 ALS 类除草剂抗性小麦的研究创制起步较晚,成果较少。以上小麦抗性种质的主要信息详见表 3。

表 3 小麦 *ALS* 基因的抗性突变体

Table 3 Resistant mutants gained from mutations of the *ALS* gene in wheat

特性 Character	FS4	TealIMI- 15A	TealIMI- 11A	Brookton-8
核苷酸变化 Nucleotide change	无数据	无数据	G/A	G/A
氨基酸变化 Amino-acids change	S653N	S653N、 无数据	S653N	A122T
创制手段 Development method	种子诱变	种子诱变	种子诱变	种子诱变
除草剂抗性 Herbicide resistance	IMI	IMI	IMI	IMI

3 油料作物的抗性种质创制与育种利用

3.1 油菜

油菜 (*Brassica napus* L.) 是中国第一大油料作物^[43]。目前,油菜生产中单子叶杂草已基本实现化学防除,但由于油菜是双子叶植物,对多数阔叶除草剂 (如 ALS 类) 具有敏感性,油菜生产中对阔叶杂草还未实现化学防除,杂草危害严重。因此,创制 ALS 类抗性油菜种质、选育相应抗性品种对于油菜生产具有重要意义。

国外对 ALS 类除草剂抗性油菜的研究较早, Swanson 等^[44]首次报道了通过小孢子诱变获得 IMI 类除草剂抗性种质 PM1 和 PM2。PM1 是 *ALS1* 基因突变导致的 Ser653Asn 氨基酸突变,对 IMI 类除草剂具有专一抗性,对咪唑乙烟酸的抗性浓度达 50 g a.i./hm², 而 PM2 是 *ALS3* 基因突变导致的 Trp574Leu 氨基酸突变,对咪唑乙烟酸的抗性浓度达 300 g a.i./hm², 对 SU 类除草剂存在交互抗性。当两个突变同时出现在油菜中时,对 IMI 类除草剂的抗性会更强^[3]。国外商业化种植的抗 IMI 类除草剂油菜大多是由 PM1 和 PM2 聚合选育而成,如

在加拿大广泛种植的 Smart Canola。

中国首次公开报道的抗 ALS 类除草剂油菜种质是 M9^[45],属于自然突变体,*ALS1* 基因突变导致的 Ser653Asn 氨基酸突变,对 IMI 类除草剂具有专一抗性,对咪唑乙烟酸的抗性浓度最高可达 400 mg/L^[46]。随后通过 EMS 诱变创制了 SU 类除草剂抗性油菜种质 M342^[47],抗性位点是 *ALS3* 基因的 Trp574Leu 氨基酸突变^[48]。Li 等^[49]通过 EMS 诱变筛选获得突变体 M45,其突变位点为 *ALS3* 的 Pro197Ser 氨基酸替换,对苯磺隆的抗性浓度为 2.5 mg/L。利用同样方法,孙妍妍等^[50]报道了 3 株抗性突变体 K1、K4、K5,对苯磺隆的抗性浓度为 6 mg/L,其中 K1、K4 的突变与 M45 相同,而 K5 是 *ALS1* 的 Pro197Ser 氨基酸替换。李小童等^[51]筛选获得抗性种质 12WH318,经鉴定抗性位点与 M9 相同,对甲基咪草烟的抗性浓度达 240 mg/L。Guo 等^[52]利用通过诱变获得的抗性种质 PN19 和 M342 聚合育种创制获得了高抗 SU 类除草剂种质 5N,抗性浓度是除草剂推荐使用浓度的 16 倍,突变位点为 *ALS1* 和 *ALS3* 基因发生的 Trp574Leu 双氨基酸替换。通过二轮 EMS 诱变,Guo 等^[53]还获得了抗性种质 DS3,抗性浓度是除草剂推荐使用浓度的 12~16 倍,突变位点分别为 *ALS1* 的 Pro197Leu 和 *ALS3* 的 Trp574Leu 氨基酸替换。以上这些抗性种质都来源于非转基因诱变技术,易被商业化利用。目前,江苏省农业科学院利用抗性种质 5N 已成功育成中国首个非转基因抗除草剂油菜品种宁 R101,随后又育成了第二个品种宁 R201^[52]。在大规模推广应用中发现,宁 R101 具有生长势强、丰产性好、增产潜力大、抗倒耐寒等特点,适合油菜机械化生产。以上油菜抗性种质的主要信息详见表 4。

3.2 大豆

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 和油菜一样是双子叶植物,对有些 ALS 类除草剂敏感,易受上茬作物残留除草剂影响而导致产量降低。但由于大豆可以迅速代谢 IMI,无需创制 IMI 抗性种质^[54]。20 世纪 80 年代中期,杜邦研究人员对大豆品种 Williams 82 EMS 诱变后使用 100 μg/L 的氯磺隆筛选获得了大豆品系 W20,经鉴定其对 SU 类除草剂表现出高度的耐受性,这是由 4 号染色体上半显性等位基因 *Als1* 突变所导致的 Pro197Ser 氨基酸替换^[55-56]。20 世纪 80 年代后期,北美和南美的育种公司广泛利用 W20 大豆品系,并于 90 年代初期以商业化品种 STS 在北美和南美广泛种植,

表 4 油菜 ALS 基因的抗性突变体

Table 4 Resistant mutants gained from mutations of the ALS gene in rapeseed

特性 Character	PM1	PM2	M9	M342	M45	K1	K4	K5	12WH318	PN19	5N	DS3
核苷酸变化 Nucleotide change	G/A	G/T	G/A	G/T	C/T	C/T	C/T	C/T	G/A	G/T	G/T, G/T	C/T, G/T
氨基酸变化 Amino-acids change	S653N	W574L	S653N	W574L	P197S	P197S	P197S	P197S	S653N	W574L	W574L、 W574L	P197L、 W574L
创制手段 Development method	小孢子 诱变	小孢子 诱变	自然突变	种子诱变	种子诱变	种子诱变	种子诱变	种子诱变	无数据	种子诱变	种子诱变	种子诱变
除草剂抗性 Herbicide resistance	IMI	IMI、 SU	IMI	SU	SU	SU	SU	SU	IMI	SU	SU	SU

如 BTK323STS。为获得对 SU 类除草剂更强的抗性,对 W20 进行第 2 轮诱变,经筛选获得 W4-4,其较 W20 对 SU 类除草剂抗性更强 ($>70 \text{ g a.i./hm}^2$ 的苯磺隆)^[57]。遗传分析发现, W4-4 抗性由 2 个半显性等位基因 *Als1* 与 *Als2* 控制,分别为 Pro197Ser 和 Trp574Leu 氨基酸替换所致。研究还发现,这 2 个突变位点协同可提高大豆对 ALS 类除草剂的耐受性^[58]。以上大豆抗性种质的主要信息详见表 5。

表 5 大豆 ALS 基因的抗性突变体

Table 5 Resistant mutants gained from mutations of the ALS gene in soybean

特性 Character	W20	W4-4
核苷酸变化 Nucleotide change	C/T	C/T, G/T
氨基酸变化 Amino-acids change	P197S	P197S, W574L
创制手段 Development method	种子诱变	种子诱变
除草剂抗性 Herbicide resistance	SU	SU

3.3 向日葵

向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 是重要的油料作物之一,基因组中有 3 个 ALS 功能基因,即 *Als1*、*Als2* 和 *Als3*^[59]。到目前为止, *Als1* 是这个大家族中唯一发现能通过突变使向日葵具有除草剂抗性的基因成员,并相继发现和获得了多个抗性等位基因^[60],分别为 *Als1-1*、*Als1-2*、*Als1-3*、*Als1-4*。向日葵对 ALS 类除草剂非常敏感,邻近作物施用都会对其产

生不利影响,且易受残留除草剂药害。因此,创制抗性种质是向日葵对除草剂敏感的有效解决手段之一。

国外研究人员早在 2000 年左右就发现对 ALS 类除草剂具有抗性的野生向日葵种群^[61-62]。通过常规育种方法,将抗性性状引入到向日葵优良品系,开发了 IMI 和 SU 类抗性品种^[63]。第一个商业化的 IMI 类除草剂耐受品种抗性来源于品系 Imisun,其 *Als1-1* 基因上发生了 Ala205Val 氨基酸替代,使其对 IMI 类除草剂具有中等抗性^[64],杂交种于 2004 年在美国、阿根廷和土耳其推广应用。随后,通过 EMS 种子诱变创制出抗 IMI 类除草剂品系 CLHA-Plus,其抗性源于 *Als1-3* 基因的 Ala122Thr 氨基酸替换,对甲氧咪草烟的抗性浓度为 200 g a.i./hm^2 ^[62],但尚未商业化应用。Kolkman 等^[59]鉴定出突变体材料 AHASL-2 近交系中存在 Pro197Leu 的氨基酸替换,具有高水平的 SU 抗性,对苯磺隆的抗性浓度达 100 g a.i./hm^2 ,且具有低水平的 IMI 和 TP 抗性。从阿根廷野生向日葵中开发出对 IMI 和 SU 类除草剂高度耐受的 RW-B 品系,抗性由 *Als1-4* 的 Trp574Leu 突变所致^[65],在 SU 类除草剂 (24 g a.i./hm^2 甲酰胺磺隆、 25 g a.i./hm^2 氯磺隆和 100 g a.i./hm^2 烟嘧磺隆)、IMI 类除草剂 (100 g a.i./hm^2 甲氧咪草烟、 100 g a.i./hm^2 甲基咪草烟以及 160 g a.i./hm^2 和 320 g a.i./hm^2 的灭草烟)、PB 类除草剂 (80 g a.i./hm^2 双草醚钠) 和 TP 类除草剂 (67 g a.i./hm^2 氯酯磺草胺) 处理下,都表现出高水平抗性,但尚未完成商业化应用。以上向日葵抗性种质的主要信息详见表 6。

表 6 向日葵 *ALS* 基因的抗性突变体Table 6 Resistant mutants gained from mutations of the *ALS* gene in sunflower

特性 Character	Imisun	AHASL-2 近交系 AHASL-2 inbred lines	CLHA-Plus	RW-B
核苷酸变化 Nucleotide change	C/T	C/T	G/A	G/T
氨基酸变化 Amino-acids change	A205V	P197S	A122T	W574L
创制手段 Development method	自然突变	自然突变	种子诱变	自然突变
除草剂抗性 Herbicide resistance	IMI	IMI、SU、TP	IMI	IMI、SU、TP、PB

4 其他作物的抗性种质创制与育种利用

除了主要粮食和油料作物,其他植物中也发现了 *ALS* 突变的抗性种质,如鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* L.)、甜菜 (*Beta vulgaris* L.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 等。据报道,鹰嘴豆的 2 个抗性品种 CDC Alma 和 CDC Cory 都是 *ALS1* 基因突变导致的 Ala205Val 氨基酸替代,与向日葵 Imisun 的突变一致,能对 IMI 类除草剂 (30 g a.i./hm²) 产生耐受性^[66-67]。甜菜突变体 Sir-13 是和向日葵 CLHA-Plus 相同的 Ala122Thr 突变,仅对 IMI 类除草剂耐受 (I_{50} 是野生型的 40 倍),而突变体 Sur 是和油菜 M45 相同的 Pro197Ser 突变,对 SU 类和 TP 类除草剂都能产生耐受性 (I_{50} 分别是野生型的 1000 倍和 50 倍),但不能对 IMI 产生耐受性。然而,甜菜突变体 93R30B 同时具有 Sir-13 和 Sur 的特性,并且对 IMI 类、SU 类和 TP 类除草剂都具有交互抗性 (I_{50} 分别是野生型的 1000 倍、4300 倍和 200 倍)^[35,68]。烟草中报道了来源于组织培养的抗性品系 KS-43,对 IMI 类、SU 类、PB 类和 TP 类除草剂均具有交互抗性 (I_{50} 分别是野生型的 118 倍、520 倍、188 倍和 433 倍)^[69]。另外,还发现了其他烟草突变体,例如 S4 和 SU-27D5,其中 SU-27D5 的突变与甜菜 Sur 一致,但对 IMI 类和 SU 类除草剂存在交互抗性 (I_{50} 分别是野生型的 150 倍和 50~785 倍)^[70-71]。棉花突变体 DO-2 对 IMI 类和 PB 类除草剂表现出较高的抗性 (I_{50} 分别是野生型的 2000 倍和 4000 倍以上),但对 SU 类和 TP 类除草剂的耐受性相对较低 (I_{50} 分别是野生型的 80 倍和 90 倍左右),而 PS-3 对 TP 类和 SU 类除草剂中的一种(噻吩磺隆)具有高抗性 (I_{50} 分别是野生型的 1000~2000 倍和 1500 倍),但对 IMI 类和 PB 类具有极低抗性 (I_{50} 分别是野生型的 1.2 倍和 13 倍)^[69]。有研究人员通过对马铃薯体细胞选择 (20 μg/L 氯磺隆) 获得突变体

CR06 和 CR27,其中 CR06 突变位点与甜菜 Sur 一致,而 CR27 则是 Trp574Arg 突变,但都产生了 SU 类除草剂抗性^[72]。对大麦品种 Bob 进行叠氮化钠诱变和 34.7 g a.i./hm² 甲氧咪草烟筛选,得到 IMI 抗性突变体,其突变位点与水稻 PWC16 一致^[11]。显然,在大多数作物中可以通过不同的诱变方式及诱变不同的组织或器官来创制抗 *ALS* 类除草剂种质或基因,研究也发现在不同的植物中不同突变位点间存在抗性效应的差异。在育种利用方面,与主要粮食和油料作物相比,这些作物的抗性性状大多尚未进行商业化的抗性品种开发与应用,抗性育种利用潜力还需要进一步深入研究和评估。

5 基因工程育种

利用自然突变或化学诱变来获得抗除草剂种质虽然在应用上限制较小,但自然突变频率低、抗性差,育种利用困难。与自然突变相比,化学诱变虽然大幅度增加了获得抗性突变及高抗种质的效率,但产生的突变是随机的,一般都需要经过大规模筛选鉴定才能获得具有育种利用价值的种质或基因。

通过向植物中引入外源抗性基因是培育抗除草剂作物的主要策略之一。然而,转基因作物产品在食品安全、环境和生物安全等方面管理程序繁琐,耗时和成本高昂,严重限制了转基因抗性作物的推广应用^[73-74]。近年来,基因编辑技术特别是 CRISPR/Cas9 的快速发展为解决转基因应用的难题带来希望。研究者们开始利用基因编辑技术创制 *ALS* 类除草剂抗性种质。与传统的自然突变和化学诱变相比,基因编辑技术更加精准、高效。虽然编辑种质在利用方面仍存在争议,但相对于传统的转基因作物,争议较小,较易被公众接受。重要的是,与传统方法相比,CRISPR/Cas9 技术与植物组培的结合,能以更快速度和更高质量对已知关键 *ALS* 基因位点进行编辑,从而可以将抗除草剂性状直接定向精准引入到相关作物优良品系中。如 Li 等^[75] 构

建 CT-nCas9 编辑载体 (Pro197Ser), 通过农杆菌导入玉米自交系 B73 的原生质体, 成功率达 13.8%。抗性效应鉴定表明, 单基因突变体对氯磺隆抗性是推荐使用浓度的 5 倍, 而双基因突变体抗性是推荐使用浓度的 15 倍, 且其他农艺性状均未受影响。Sun 等^[76]构建了包含 2 个 sgRNA 和 Cas9 的编辑载体, 向水稻 ALS 基因中同时引入了 2 个突变 (Trp574Leu、Ser653Ile), 之后通过粒子轰击将载体导入愈伤组织, 在 5 叶期施用 100 $\mu\text{mol/L}$ 双草醚, 再生植株表现正常, 而野生型全部死亡。Wu 等^[77]利用胞嘧啶碱基编辑器将 C-T 的点突变 (Pro197Ser) 引入油菜 ALS1 基因, 通过农杆菌转化获得 SU 类除草剂抗性突变体, 杂合植株和纯合植株对苯磺隆的抗性分别为 10 mg/L 和 15 mg/L。Cheng 等^[78]建立并开发了 A3A-PBE 系统, 能有效地将油菜的碱基 C 转换为 T, 编辑植株 (Pro197Phe) 在 200 mg/L 苯磺隆处理下生长正常。通过基因编辑技术可以更快获得相应除草剂的抗性性状, 但这些突变性状在我国商业化育种应用上依然存在较大限制, 基因编辑专利技术还受到知识产权保护, 编辑作物是否参照转基因作物安全管理在不同国家也存在争议。

在中国, 多数转基因作物尚未被批准进入商业化生产, 基因编辑作物未有定论, 但非转基因作物品种却不受限制, 且易被公众接受。然而, 多数作物的抗 ALS 类除草剂基因受国际知识产权保护, 商业化应用需缴纳相应的知识产权专利费用, 会增加种子生产成本, 可以通过创制具有自主知识产权的非转基因抗 ALS 类除草剂作物种质和品种解决这一“卡脖子”困境。

6 小结与展望

抗除草剂种质是随着高效除草剂研发而创制的, 特定的抗性作物品种与除草剂结合使用是现代农业控制杂草的有效手段。ALS 类除草剂因高效、低毒等优点而被广泛应用, 进而抗 ALS 类除草剂作物种质也通过各种手段被不断创制。例如, 早期研究人员通过花粉小孢子诱变获得的油菜、种子化学诱变获得的小麦和水稻、花粉诱变获得的玉米以及从自然突变培育的向日葵, 这些抗性种质大多都已经应用于商业化育种。随后, 一些研究利用转基因技术开发抗 ALS 类除草剂植物, 如烟草^[79]、拟南芥^[80]和 大豆^[81], 但是由于转基因安全问题, 这些转基因作物大多并没有得到实际应用。近年来, 随着基因编辑技术的发展, 一些研究利用单碱基精确编

辑获得了抗 ALS 类除草剂作物突变体, 例如抗 SU 类和 IMI 类的小麦^[82]、抗 SU 类的玉米^[75]和甘蓝型油菜^[77]等, 但这些种质的育种应用价值和释放风险还有待后续深入研究。

当前, ALS 抑制剂类除草剂的 IMI 类和 SU 类在玉米、水稻、小麦、向日葵等大田作物生产使用最为广泛, 对应的抗性种质的研究也比较深入。然而, 其他类型的 ALS 类除草剂抗性种质的创制却较为缓慢。虽然 IMI 类和 SU 类除草剂的使用有效降低了杂草的危害, 但是单一除草剂长期、高频使用会大大增加抗性杂草出现的概率。至今已发现超过 150 种具有 ALS 类除草剂抗性的杂草, 如常见作物田杂草的稗草、千金子等^[83]。通过开发与 ALS 类除草剂作用模式不同的抗性品种与现有的 ALS 类除草剂轮换使用及混用可以有助于缓解 ALS 类除草剂抗性杂草问题。如将磺酰草吡啶 (Pyrasulfotole) 引用到禾谷类作物中进行阔叶杂草防除, 可有效控制 ALS 类除草剂的抗性杂草^[84]。针对部分抗性杂草, 可以选择性使用土壤活性低的灭生性除草剂或人工除草进行定点清除。当然, 也可以利用作物轮作、机械杂草控制和杂草种子销毁等田间管理措施和手段, 以确保抗 ALS 类除草剂作物利用的可持续性。ALS 类除草剂的持续使用及残留还会影响后茬作物的品质与产量, 引起土壤微生物种群的变化, 其中最为严重的是 IMI 类除草剂。其在土壤中主要靠水解和微生物降解分解, 半衰期在干旱环境甚至可达 2~3 年, 极易对后茬敏感作物如小麦、油菜等造成药害, 导致产量降低^[85]。因此创制对多种 ALS 类除草剂以及其他类型的除草剂具有抗性的多元化复合性状的作物种质是现代化农业生产杂草防控的必然需求。在现已明确的除草剂抗性与靶标关键酶突变位点的关系基础上, 当今高效基因编辑技术和转基因工程的发展为创制多元化的除草剂复合抗性性状的种质资源提供了可能。如 Zhang 等^[82]利用胞嘧啶碱基编辑器定向突变小麦品种科农 199 的 *TaALS* 或 *TaACCcase* 基因, 产生了对 SU 类、IMI 类或芳氧苯氧丙酸类除草剂具有抗性的突变体。其中, 靶向 *TaALS* 基因 P174 位点产生的抗性突变体能够对烟嘧磺隆产生抗性。靶向 *TaALS* 基因 P174 和 G631 位点获得的突变体对田间使用剂量的甲咪唑烟酸的抗性提高 3~5 倍。此外, 靶向 *TaACCcase* 基因的 A1992 位点产生的突变体对精喹禾灵表现出抗性。Kuang 等^[86]应用单碱基编辑技术介导的植物内源基因定向进化技术, 开发 4 个自然界中未

曾被发现的、对PB类除草剂具有不同抗性程度的新等位基因,并通过单碱基编辑技术引入到水稻品种南粳46中。未来,随着作物功能基因研究的不断深入,与除草剂抗性相关的基因、基因调控网络模块的持续发现以及基因组编辑和分子设计育种技术上的突破和实践,将会有更多的新型抗除草剂种质被创制,为农业生产提供多样化的杂草防控新途径。

参考文献

- [1] Oerke E C. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 2006, 144(1): 31-43
- [2] Bijanzadeh E, Naderi R, Behpoori A. Interrelationships between oilseed rape yield and weeds population under herbicides application. *Australian Journal of Crop Science*, 2010, 4(3): 155-162
- [3] Tan S Y, Evans R R, Dahmer M L, Singh B K, Shaner D L. Imidazolinone-tolerant crops: History, current status and future. *Pest Management Science*, 2005, 61(3): 246-257
- [4] 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
- [5] Liu Y D, Li Y Y, Wang X Y. Acetohydroxyacid synthases: Evolution, structure, and function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(20): 8633-8649
- [6] Chipman D, Barak Z A, Schloss J V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: Acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998, 1385(2): 401-419
- [7] Duggleby R G, Pang S S. Acetohydroxyacid synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 33(1): 1-36
- [8] Délye C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: A major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, 2013, 69(2): 176-187
- [9] Yu Q, Powles S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1340-1350
- [10] Han H P, Yu Q, Purba E, Li M, Walsh M, Friesen S, Powles S B. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, 2012, 68(8): 1164-1170
- [11] Lee H, Rustgi S, Kumar N, Burke I, Yenish J P, Gill K S, von Wettstein D, Ullrich S E. Single nucleotide mutation in the barley *acetohydroxy acid synthase* (*AHAS*) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(21): 8909-8913
- [12] Délye C, Pernin F, Scarabel L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science*, 2011, 180(2): 333-342
- [13] Scarabel L, Pernin F, Délye C. Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Science*, 2015, 238: 158-169
- [14] Yuan J S, Tranel P J, Stewart Jr C N. Non-target-site herbicide resistance: A family business. *Trends Plant Science*, 2007, 12: 6-13
- [15] Gressel J. Molecular biology of weed control. *Transgenic Research*, 2000, 9(4-5): 355-382
- [16] Svizzero S. Sustainability, efficiency, and circularity of weedy rice management strategies. *Circular Economy and Sustainability*, 2021, 1(4): 1281-1296
- [17] Chauhan B S. Strategies to manage weedy rice in Asia. *Crop Protection*, 2013, 48: 51-56
- [18] 许红云,熊海波,朱寿,石瑜敏,王威豪,刘百龙,徐家星,文建成,李东宣,陈丽娟.栽培稻及其近缘野生种间杂交揭示杂草稻的起源. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6): 1031-1036
- Xu H Y, Xiong H B, Zhu Q, Shi Y M, Wang W H, Liu B L, Xu J X, Wen J C, Li D X, Chen L J. Origin of weedy rice as revealed by hybridizations among cultivated rice and its wild relatives. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(6): 1031-1036
- [19] Croughan T P. Herbicide resistant rice. US5773704. 1998-06-30
- [20] Webster E P, Masson J A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. *Weed Science*, 2001, 49(5): 652-657
- [21] Gealy D R, Mitten D H, Rutger J N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): Implications for weed management. *Weed Technology*, 2003, 17(3): 627-645
- [22] Croughan T P. Resistance to acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides. US09090904. 2015-07-28
- [23] Shoba D, Raveendran M, Manonmani S, Utharasu S, Dhivyapriya D, Subhasini G, Ramchandrar S, Valarmathi R, Grover N, Krishnan S G, Singh A K, Jayaswal P, Kale P, Ramkumar M K, Mithra S V A, Mohapatra T, Singh K, Singh N K, Sarla N, Sheshshayee M S, Kar M K, Robin S, Sharma R P. Development and genetic characterization of a novel herbicide (imazethapyr) tolerant mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, 2017, 10(1): 10
- [24] 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
- [25] 王芳权,杨杰,范方军,李文奇,王军,许扬,朱金燕,费云燕,仲维功.水稻抗咪唑啉酮类除草剂基因ALS功能标记的开发与应用. *作物学报*, 2018, 44(3): 324-331
- Wang F Q, Yang J, Fan F J, Li W Q, Wang J, Xu Y, Zhu J Y, Fei Y Y, Zhong W G. Development and application of the functional marker for imidazolinone herbicides resistant ALS gene in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(3): 324-331
- [26] Chen L, Gu G, Wang C X, Chen Z F, Yan W, Jin M, Xie G, Zhou J L, Deng X W, Tang X Y. Trp₃₄₈ Met mutation of acetolactate synthase in rice confers resistance to a broad spectrum of ALS-inhibiting herbicides. *Crop Journal*, 2021, 9

- (4): 750-758
- [27] 毕俊国, 谭金松, 刘毅, 张安宁, 王飞名, 刘国兰, 余新桥, 罗利军. 抗咪唑啉酮类除草剂水稻种质的筛选鉴定. 植物遗传资源学报, 2020, 21(4): 804-808
Bi J G, Tan J S, Liu Y, Zhang A N, Wang F M, Liu G L, Yu X Q, Luo L J. Screening and identification of rice germplasm resistant to imidazolinone herbicide. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(4): 804-808
- [28] Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, Kawai K, Toriyama K. A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice. Plant Molecular Biology, 2007, 64(1-2): 219-224
- [29] Kawai K, Kaku K, Izawa N, Shimizu T, Fukuda A, Tanaka Y. A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS-inhibiting herbicides. Journal of Pesticide Science, 2007, 32(2): 89-98
- [30] Siehl D L, Bengtson A S, Brockman J P, Butler J H, Kraatz G W, Lamoreaux R J, Subramanian M V. Patterns of cross-tolerance to herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase in commercial corn hybrids designed for tolerance to imidazolinones. Crop Science, 1996, 36(2): 274-278
- [31] Anderson P C, Georgeson M. Herbicide-tolerant mutants of corn. Genome, 1989, 31(2): 994-999
- [32] Newhouse K, Singh B, Shaner D, Stidham M. Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 83(1): 65-70
- [33] Bernasconi P, Woodworth A R, Rosen B A, Subramanian M V, Siehl D L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(29): 17381-17385
- [34] Dietrich G E. Imidazolinone resistant AHAS mutants. US5731180. 1998-03-24
- [35] Wright T R, Bascomb N F, Sturmer S F, Penner D. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. Weed Science, 1998, 46(1): 13-23
- [36] Wright T R, Penner D. Corn (*Zea mays*) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibiting herbicides. Weed Science, 1998, 46(1): 8-12
- [37] Bailey W A, Wilcut J W. Tolerance of imidazolinone-resistant corn (*Zea mays*) to diclosulam. Weed Technology, 2003, 17(1): 60-64
- [38] Currie R S, Kwon C S, Penner D. Magnitude of imazethapyr resistance of corn (*Zea mays*) hybrids with altered acetolactate synthase. Weed Science, 1995, 43(4): 578-582
- [39] Newhouse K E, Smith W A, Starrett M A, Schaefer T J, Singh B K. Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. Plant Physiology, 1992, 100(2): 882-886
- [40] Pozniak C J, Hucl P J. Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. Crop Science, 2004, 44(1): 23-30
- [41] Anderson J A, Matthiesen L, Hegstad J. Resistance to an imidazolinone herbicide is conferred by a gene on chromosome 6DL in the wheat line cv. 9804. Weed Science, 2004, 52(1): 83-90
- [42] Li D, Barclay I, Jose K, Stefanova K, Appels R. A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: Improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. Molecular Breeding, 2008, 22(2): 217-225
- [43] 李利霞, 陈碧云, 闫贵欣, 高桂珍, 许鲲, 谢婷, 张付贵, 伍晓明. 中国油菜种质资源研究利用策略与进展. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 1-19
Li L X, Chen B Y, Yan G X, Gao G Z, Xu K, Xie T, Zhang F G, Wu X M. Proposed strategies and current progress of research and utilization of oilseed rape germplasm in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(1): 1-19
- [44] Swanson E B, Herrgesell M J, Arnoldo M, Sippell D W, Wong R S C. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theoretical and Applied Genetics, 1989, 78(4): 525-530
- [45] 高建芹, 浦惠明, 戚存扣, 张洁夫, 龙卫华, 胡茂龙, 陈松, 陈新军, 陈锋, 顾慧. 抗咪唑啉酮油菜种质的发现与鉴定. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 369-373
Gao J Q, Pu H M, Qi C K, Zhang J F, Long W H, Hu M L, Chen S, Chen X J, Chen F, Gu H. Identification of imidazolidone-resistant oilseed rape mutant. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(3): 369-373
- [46] 胡茂龙, 浦惠明, 高建芹, 龙卫华, 戚存扣, 张洁夫, 陈松. 油菜乙酰乳酸合成酶抑制剂类除草剂抗性突变体 M9 的遗传和基因克隆. 中国农业科学, 2012, 45(20): 4326-4334
Hu M L, Pu H M, Gao J Q, Long W H, Qi C K, Zhang J F, Chen S. Inheritance and gene cloning of an ALS inhabiting herbicide resistant mutant line M9 in *Brassica napus*. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(20): 4326-4334
- [47] 胡茂龙, 浦惠明, 张洁夫. 我国抗 ALS 类除草剂油菜种质创制与研究进展. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 679-686
Hu M L, Pu H M, Zhang J F. Research advances of rapeseed germplasms with ALS-inhibiting herbicides resistance in China. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2018, 40(5): 679-686
- [48] 程丽, 胡茂龙, 浦惠明, 龙卫华, 高建芹, 陈锋, 周晓婴, 张维, 陈松, 张洁夫. M342 抗除草剂基因 CAPS 标记的开发与应用. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 241-247
Cheng L, Hu M L, Pu H M, Long W H, Gao J Q, Chen F, Zhou X Y, Zhang W, Chen S, Zhang J F. Development and application of the CAPS marker for herbicide-resistant gene in M342. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2019, 35(2): 241-247
- [49] Li H T, Li J J, Zhao B, Wang J, Yi L C, Liu C, Wu J S, King G J, Liu K D. Generation and characterization of tribenuron-methyl herbicide-resistant rapeseed (*Brassica napus*) for hybrid seed production using chemically induced male sterility. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(1): 107-118
- [50] 孙妍妍, 曲高平, 黄谦心, 吕金洋, 郭媛, 胡胜武. 甘蓝型油菜抗苯磺隆突变体 ALS 基因分析与 SNP 标记. 中国油料作物学报, 2015, 37(5): 589-595
Sun Y Y, Qu G P, Huang Q X, Lv J Y, Guo Y, Hu S W. SNP markers for acetolactate synthase genes from tribenuron-methyl resistant mutants in *Brassica napus* L.. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015, 37(5): 589-595

- [51] 李小童, 吴磊, 贾艳丽, 李珂琪, 陈永勤, 卢长明. 油菜新种质 12WH318 咪唑啉酮抗性遗传及基因克隆和表达. 中国油料作物学报, 2015, 37(3): 269-276
Li X T, Wu L, Jia Y L, Li K Q, Chen Y Q, Lu C M. Inheritance of imidazolinone resistance in rapeseed 12WH318 and *BnALS* gene cloning. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015, 37(3): 269-276
- [52] 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(10): 2811-2824
- [53] Guo Y, Liu C L, Long W H, Gao 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
- [54] Tecle B, Dacunha A, Shaner D L. Differential routes of metabolism of imidazolinones: Basis for soybean (*Glycine max*) selectivity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1993, 46(2): 120-130
- [55] Sebastian S A, Fader G M, Ulrich J F, Forney D R, Chaleff R S. Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. Crop Science, 1989, 29(6): 1403-1408
- [56] Ghio C, Ramos M L, Altieri E, Bulos M, Sala C A. Molecular characterization of *Als1*, an acetohydroxyacid synthase mutation conferring resistance to sulfonylurea herbicides in soybean. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(12): 2957-2968
- [57] Sebastian S A. Soybean plants with dominant selectable trait for herbicide resistance. US5084082. 1992-01-28
- [58] Walter K L, Strachan S D, Ferry N M, Albert H H, Castle L A, Sebastian S A. Molecular and phenotypic characterization of *Als1* and *Als2* mutations conferring tolerance to ALS herbicides in soybean. Pest Management Science, 2014, 70(12): 1831-1839
- [59] Kolkman J M, Slabaugh M B, Bruniard J M, Berry S, Bushman B S, Olungu C, Maes N, Abratti G, Zambelli A, Miller J F, Leon A, Knapp S J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(6): 1147-1159
- [60] Sala C A, Bulos M, Echarte A M. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. Crop Science, 2008, 48(5): 1817-1822
- [61] Al-Khatib K, Baumgartner J R, Peterson D E, Currie R S. Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). Weed Science, 1998, 46(4): 403-407
- [62] White A D, Owen M D K, Hartzler R G, Cardina J. Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Science, 2002, 50(4): 432-437
- [63] Miller J F, Al-Khatib K. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2 resistant to tribenuron herbicide. Crop Science, 2004, 44(3): 1037-1038
- [64] Sala C A, Bulos M, Echarte M, Whitt S R, Ascenzi R. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 118(1): 105-112
- [65] Sala C A, Bulos M. Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(2): 355-364
- [66] Taran B, Warkentin T D, Vandenberg A, Holm F A. Variation in chickpea germplasm for tolerance to imazethapyr and imazamox herbicides. Canadian Journal of Plant Science, 2010, 90(1): 139-142
- [67] Thompson C, Tar'an B. Genetic characterization of the acetohydroxyacid synthase (*AHAS*) gene responsible for resistance to imidazolinone in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127(7): 1583-1591
- [68] Wright T R, Penner D. In vitro and whole-plant magnitude and cross-resistance characterization of two imidazolinone-resistant sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. Weed Science, 1998, 46(1): 24-29
- [69] Subramanian M V, Hung H Y, Dias J M, Miner V W, Butler J H, Jachetta J J. Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. Plant Physiology, 1990, 94(1): 239-244
- [70] Harms C T, Armour S L, DiMaio J J, Middlesteadt L A, Murray D, Negrotto D V, Thompson-Taylor H, Weymann K, Montoya A L, Shillito R D, Jen G C. Herbicide resistance due to amplification of a mutant acetohydroxyacid synthase gene. Molecular & General Genetics, 1992, 233(3): 427-435
- [71] Mazur B J, Chui C F, Smith J K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. Plant Physiology, 1987, 85(4): 1110-1117
- [72] Barrell P J, Latimer J M, Samantha J, 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(1): 49
- [73] 杨庆文. 转基因水稻的生物安全性问题及其对策. 植物遗传资源学报, 2003, 4(3): 261-264
Yang Q W. Potential biological safety problems and countermeasures in developing transgenic rice in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(3): 261-264
- [74] 肖本泽, 张征锋, 何亮, 龚耀, 赵爽. 抗除草剂杂交水稻亲本的配合力分析. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 562-570
Xiao B Z, Zhang Z F, He L, Gong Y, Zhao S. Combining ability analysis of parents of herbicide-resistant indica hybrids. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(4): 562-570
- [75] Li Y M, Zhu J J, Wu H, Liu C L, Huang C L, Lan J H, Zhao Y M, Xie C X. Precise base editing of non-allelic acetolactate synthase genes confers sulfonylurea herbicide resistance in maize. Crop Journal, 2020, 8(3): 449-456
- [76] Sun Y W, Zhang X, Wu C Y, He Y B, Ma Y Z, Hou H, Guo X P, Du W M, Zhao Y D, Xia L Q. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. Molecular Plant, 2016, 9(4): 628-631
- [77] Wu J, Chen C, Xian G Y, Liu D X, Lin L, Yin S L, Sun Q F, Fang Y J, Zhang H, Wang Y P. Engineering herbicide-resistant

- oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (9): 1857-1859
- [78] Cheng H T, Hao M Y, Ding B L, Mei D H, Wang W X, Wang H, Zhou R J, Liu J, Li C, Hu Q. Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A - PBE system. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 19 (1): 87-97
- [79] Slavov S, Valkov V, Batchvarova R, Atanassova S, Alexandrova M, Atanassov A. Chlorsulfuron resistant transgenic tobacco as a tool for broomrape control. *Transgenic Research*, 2005, 14 (3): 273-278
- [80] Song H Y, Cho S J, Lim H K, Park N J, Hwang I T. Transformation a mutant *Monochoria vaginalis* acetolactate synthase (ALS) gene renders *Arabidopsis thaliana* resistant to ALS inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2010, 97 (3): 223-238
- [81] Mathesius C A, Barnett J F, Cressman R F, Ding J, Carpenter C, Ladics G S, Schmidt J, Layton R J, Zhang J X Q, Appenzeller L M, Carlson G, Ballou S, Delaney B. Safety assessment of a modified acetolactate synthase protein (GM-HRA) used as a selectable marker in genetically modified soybeans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 55 (3): 309-320
- [82] Zhang R, Liu J, Chai Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K L, Li J Y, Jiang L J, Gao C X. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nature Plants*, 2019, 5 (5): 480-485
- [83] 陈涛, 张善磊, 赵凌, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 姚姝, 赵春芳, 梁文化, 王才林. ALS 抑制剂类除草剂抗性水稻功能标记的开发与验证. *中国水稻科学*, 2018, 32 (2): 137-145
- Chen T, Zhang S L, Zhao L, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao Q Y, Zhou L H, Yao S, Zhao C F, Liang W H, Wang C L. Development and verification of a functional marker associated with resistance to ALS inhibitor herbicide. *Chinese Journal of Rice Science*, 2018, 32 (2): 137-145
- [84] Schmitt M H, van Almsick A, Willms L. Discovery and chemistry of pyrasulfotole, a new dicot herbicide for cereal production. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2008, 61: 7-14
- [85] 吴云雨, 肖宁, 余玲, 蔡跃, 潘存红, 李育红, 张小祥, 黄年生, 周长海, 季红娟, 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
- [86] Kuang Y J, Li S F, Ren B, Yan F, Spetz C, Li X G, Zhou X P, Zhou H B. Base-editing-mediated artificial evolution of *OsALS1* in planta to develop novel herbicide-tolerant rice germplasms. *Molecular Plant*, 2020, 13 (4): 565-572