

王歆凯, 李 阳, 凌溪铁, 等. 水稻抗甲咪唑烟酸突变体对多种 ALS 抑制剂类除草剂的抗性分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(9): 1665-1673.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.09.001

水稻抗甲咪唑烟酸突变体对多种 ALS 抑制剂类除草剂的抗性分析

王歆凯¹, 李 阳^{1,2}, 凌溪铁¹, 裘 实¹, 张保龙^{1,2,3}, 王金彦^{2,3}

(1.海南大学热带农林学院, 海南 海口 570228; 2.江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014; 3.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 为创制抗乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂类除草剂水稻种质、促进 ALS 抑制剂类除草剂在水稻生产中的应用,本研究以连梗 15 为试验材料,利用甲磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, EMS)诱变和甲咪唑烟酸除草剂喷施处理,筛选获得抗甲咪唑烟酸的水稻突变体,通过遗传分析和基因克隆明确突变体的突变位点及类型,并对野生型植株和突变体植株进行喷施无菌水(CK)和 5 种常用的 ALS 抑制剂类除草剂(甲氧咪草烟、甲咪唑烟酸、咪唑乙烟酸、甲基二磺隆和烟嘧磺隆)处理,分析突变体的抗性水平。结果表明,共筛选获得 1 个抗甲咪唑烟酸的水稻突变体,突变体 ALS 基因核苷酸序列在第 1 880 位的碱基由 G 突变为碱基 A, ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸由丝氨酸突变为天冬酰胺。喷施咪唑啉酮类除草剂甲氧咪草烟、甲咪唑烟酸和咪唑乙烟酸处理,野生型植株 ALS 活性、茎叶鲜重和根系鲜重、叶片叶绿素总含量均显著低于喷施无菌水对照(CK),突变体植株 ALS 活性、茎叶鲜重和根系鲜重、叶片叶绿素总含量与 CK 无显著差异。喷施磺酰脲类除草剂甲基二磺隆和烟嘧磺隆处理,野生型植株和突变体植株 ALS 活性、茎叶鲜重和根系鲜重、叶片叶绿素总含量均显著低于 CK。因此,本研究获得的突变体对咪唑啉酮类除草剂具有较强的抗性,但对磺酰脲类除草剂抗性相对较差。

关键词: ALS 抑制剂类除草剂; 水稻突变体; 咪唑啉酮类除草剂; 磺酰脲类除草剂; 乙酰乳酸合成酶(ALS)

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)09-1665-09

Resistance analysis of imazapic-tolerant rice mutants to various ALS-inhibiting herbicides

WANG Xinkai¹, LI Yang^{1,2}, LING Xitie¹, QIU Shi¹, ZHANG Baolong^{1,2,3}, WANG Jinyan^{2,3}

(1.School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 2.Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Nanjing 210014, China; 3.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To create rice germplasm resistant to acetolactate synthase (ALS) inhibitor herbicides and promote the application of ALS inhibitor herbicides in rice production, ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis and imazapic herbicide spraying treatment were used to screen rice mutants resistant to imazapic with Lianjing 15 as the experimental material

in this study. The mutation sites and types of the mutants were determined by genetic analysis and gene cloning. The wild-type and mutant plants were sprayed with sterile water (control, CK) and five commonly used ALS inhibitor herbicides (imazamox, imazapic, imazethapyr, mesosulfuron-methyl and nicosulfuron) to analyze the resistance level of the mutant. The results showed that one rice mutant resist-

收稿日期: 2025-04-19

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(19)3054]

作者简介: 王歆凯(1999-), 男, 山西长治人, 硕士研究生, 主要从事水稻抗除草剂育种研究。(E-mail) 13363457576@163.com

通讯作者: 张保龙(E-mail) zhb12248@hotmail.com

ant to imazapic was obtained. A nucleotide substitution from G to A was identified at position 1 880 in the *ALS* gene, resulting in a serine-to-asparagine change at the 627th amino acid residue in the *ALS* protein. The *ALS* activity, stem and leaf fresh weight, root fresh weight and total chlorophyll content of wild-type plants were significantly lower than those in the sterile water control (CK) after spraying imidazolinone herbicides imazamox, imazapic and imazethapyr. In contrast, the mutant plants showed no significant differences in these parameters compared to the CK. The *ALS* activity, stem and leaf fresh weight, root fresh weight and total chlorophyll content of wild-type and mutant plants were significantly lower than those of CK after spraying sulfonyleurea herbicides mesosulfuron-methyl and nicosulfuron. Therefore, the mutants obtained in this study exhibit strong resistance to imidazolinone herbicides but weak resistance to sulfonyleurea herbicides.

Key words: *ALS*-inhibiting herbicides; rice mutant; imidazolinone herbicides; sulfonyleurea herbicides; acetolactate synthase (*ALS*)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全球最重要的粮食作物之一。全球约 40% 人口以稻米为主粮^[1-2]。近年来,随着水稻直播生产方式的推广,稻田杂草的问题日益严重。稻田杂草能够与水稻竞争土壤养分、水分和光能,严重影响水稻产量^[3-4]。由于喷施除草剂是目前稻田杂草防治的主要手段之一,且除草剂对水稻植株普遍具有毒害作用,因此,研发抗除草剂水稻品种就显得尤为重要^[5-7]。

乙酰乳酸合成酶 (*ALS*) 是植物合成支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸) 过程中的第一个关键酶。*ALS* 能催化 2 分子丙酮酸生成乙酰乳酸,催化 1 分子丙酮酸与 1 分子 2-酮丁酸生成 2-乙酰基-2-羟基丁酸,再经过进一步的生化反应,进而合成支链氨基酸^[8-10]。*ALS* 抑制剂类除草剂以乙酰乳酸合成酶为靶标,通过与乙酰乳酸合成酶的结合抑制酶活性,进而减少或阻止支链氨基酸的合成,影响植物正常生长发育,最终导致其死亡^[11]。目前,科研人员已成功研发出 50 多种以 *ALS* 蛋白为作用靶标的除草剂,包括咪唑啉酮类 (Midazolinones, IMI)、磺酰脲类 (Sulfonyleureas, SU)、嘧啶水杨酸类 (Pyrimidylxybenzoates, PTB)、三唑并嘧啶类 (Triazolopyrimidines, TP) 和磺酰胺基羰基三唑啉酮类 (Sulfonylamino-carbonyl triazolones, SCT) 等多种类型^[12-13]。此类除草剂具有用量低、效率高、除草谱广等优点,且由于乙酰乳酸合成酶只存在于微生物和植物中,对动物和人体而言具有较高的生物安全性。目前,*ALS* 抑制剂类除草剂在玉米、花生、大豆等作物的生产中得到广泛应用。

Yu 等^[14] 的研究结果表明,作物 *ALS* 基因个别碱基的突变能够使物种获得对 *ALS* 抑制剂类除草剂的抗性。水稻 *ALS* 基因编码的蛋白质氨基酸序列中第 95 个、96 个、122 个、171 个、197 个、376 个、548 个、627 个和 628 个氨基酸的突变能使水

稻突变体获得对 *ALS* 抑制剂类除草剂的抗性^[15-16]。上述突变中,第 627 个氨基酸的突变研究较为广泛,且针对该突变已研发出多个抗性水稻品种。Gealy 等^[17] 利用甲磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate, EMS) 诱变的方法获得抗性水稻品种 CL161。王芳权等^[18] 从 7 000 多份水稻材料中筛选获得自然变异的水稻抗性品种金梗 818。陈天子等^[19] 通过 EMS 诱变籼稻 9311, 获得第 627 个氨基酸突变的抗性水稻材料。Rajguru 等^[20]、毕俊国等^[21] 研究表明,第 627 个氨基酸突变的水稻突变体对咪唑啉酮类除草剂具有较强的抗性,但对磺酰脲类除草剂的抗性相对较差。

本研究以连梗 15 为材料,利用 EMS 诱变获得抗甲咪唑啉酮的突变体,通过遗传分析和基因克隆明确 *ALS* 基因突变位点及类型,并进一步利用连梗 15 野生型和突变体进行喷施咪唑啉酮类的甲氧咪唑啉、甲咪唑啉酮和咪唑啉乙酮酸以及磺酰脲类的甲基二磺隆和烟嘧磺隆处理,分析不同处理对野生型和突变体植株 *ALS* 活性、表型和苗期农艺性状的影响,以期对不同 *ALS* 抑制剂类除草剂田间管理策略及抗性品种的抗性机制研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

本研究中的野生型水稻材料连梗 15 来自于连云港市农业科学院,杂交亲本嘉花 1 号、淮稻 5 号、苏秀 867 均来自于江苏省农业科学院农业种质资源保护与利用平台。5 种供试除草剂分别为 40 g/L 甲氧咪唑啉水剂 (江苏省农用激素工程技术研究中心有限公司产品)、240 g/L 甲咪唑啉酮水剂 (巴斯夫欧洲公司产品)、100 g/L 咪唑啉乙酮酸水剂 (山东胜邦绿野化学有限公司产品)、40 g/L 烟嘧磺隆可分散油悬

浮剂(中国农业科学院植物保护研究所廊坊农药中试厂产品)、30 g/L 甲基二磺隆可分散油悬浮剂(江苏省农用激素工程技术研究中心有限公司产品)。

1.2 抗甲咪唑烟酸除草剂水稻突变体的筛选

抗甲咪唑烟酸除草剂水稻突变体筛选试验于 2016 年在江苏省南京市六合区进行。首先取野生型连梗 15 水稻种子 25~30 kg, 在自来水中浸泡 3 h 后, 将种子置于 0.5% 含量的 EMS 溶液中, 室温下浸泡 15 h, 加入终质量浓度为 25 g/L 的硫代硫酸钠中和反应 15 min, 然后将种子置于自来水中浸泡清洗 5~6 次, 每次 5~10 min, 将清洗完毕的水稻种子撒播田间, 混收得 M_1 代植株种子, 2017 年 6 月于南京播种 M_1 种子, 收获获得 M_2 种子, 2017 年 11 月于海南播种 M_2 代种子, 待幼苗长至 3 叶 1 心时, 喷洒有效成分为 86.4 g/hm² 的甲咪唑烟酸, 14 d 后选择正常生长的植株移栽, 单株收取得 M_3 代种子, 2019 年 6 月在江苏省农业科学院试验基地种植, 7 月通过喷洒有效成分 86.4 g/hm² 甲咪唑烟酸对 M_3 代植株的抗性性状进行鉴定, 选取无分离株系收取种子并连续自交 3 代, 每代均使用有效成分 86.4 g/hm² 甲咪唑烟酸进行抗性鉴定, 最终培育获得稳定遗传的抗甲咪唑烟酸除草剂的水稻突变体材料。

1.3 突变体与野生型水稻的杂交试验

2019 年于海南, 分别使用嘉花 1 号、淮稻 5 号和苏秀 867 等水稻地方品种与具有稳定遗传的抗性突变体进行杂交, 以突变体为母本, 野生型为父本。混收 F_1 代种子, 于第 2 年种植 F_1 代, 单株收 F_2 代种子。将单株收获的 F_2 代种子种植于 125 mm×85 mm×115 mm 的植物培养盒中, 每个品种种植 4 个培养盒, 每盒种植 48 株, 使用改良型霍格兰营养液(北京酷来搏科技有限公司产品)培养。14 d 后使用有效成分 86.4 g/hm² 甲咪唑烟酸对水稻植株进行喷洒处理, 使用清水继续培养 14 d, 统计各处理生长情况。利用 IBM SPSS Statistics 27.0 和卡方检验进行杂交后代的抗性分离分析。

1.4 突变体与野生型水稻的生长试验

试验于江苏省农业科学院试验基地进行。2023 年 6 月将足量连梗 15 野生型与突变体水稻种子在 37 °C 恒温箱中进行催芽至露白, 然后将种子均匀种植在 125 mm×85 mm×115 mm 植物水培盒和 32 孔育苗盘中, 每个水培盒播 24 粒种子, 育苗盘每孔播 2~3 粒种子, 使用改良型霍格兰营养

液(北京酷来搏科技有限公司产品)培养并置于人工气候室中生长。人工气候室白天与夜间温度分别设置为 27 °C 和 20 °C, 光照 16 h/d。育苗盘中秧苗长至 2 叶 1 心时, 取野生型和突变体材料叶片进行 ALS 基因克隆与序列分析。同时进行喷施无菌水以及有效成分为 48.00 g/hm² 甲氧咪草烟、86.40 g/hm² 甲咪唑烟酸、105.00 g/hm² 咪唑乙烟酸、15.75 g/hm² 甲基二磺隆、60.00 g/hm² 烟嘧磺隆处理, 喷施处理后 1 d 和 3 d, 分别取不同处理植株叶片 4 °C 保存, 用于 ALS 活性测定。水培盒中秧苗培养 10 d 后进行喷施无菌水以及有效成分为 48.00 g/hm² 甲氧咪草烟、86.40 g/hm² 甲咪唑烟酸、105.00 g/hm² 咪唑乙烟酸、15.75 g/hm² 甲基二磺隆、60.00 g/hm² 烟嘧磺隆处理, 处理后 7 d、14 d 进行拍照记录表型, 处理后 14 d 统计野生型与突变体不同处理单株茎叶鲜重与根系鲜重, 并进行叶片叶绿素含量测定。

1.5 ALS 基因克隆和序列分析

采用 CTAB 法^[22] 提取野生型和突变体植株叶片 DNA, 在 NCBI 网站搜索水稻 ALS 基因的保守序列, 利用 NCBI 的 Primer-BLAST 在线软件(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.-cgi?LINK_LOC=BlastHome) 设计特异引物 *OsALS-F*: 5'-TCGCCCAAACCCAGAAACCC-3' 和 *OsALS-R*: 5'-CTCTTTATGGGTCATTCAGGTC-3'。以野生型和突变体 DNA 为模板, 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μL: 2×Phanta Max Buffer 25 μL、10 mmol/L dNTP Mix 1 μL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL、10 μmol/L Primer 各 1 μL、DNA 模板 1 μL、ddH₂O 20 μL。PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增片段大小正确的 PCR 产物用 PCR 清洁试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司产品]回收, 连接至 pESI-Blunt 载体上, 然后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。挑取 8 个大肠杆菌菌落进行菌落 PCR 验证, 将阳性单菌落 PCR 产物送至擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果使用 BioEdit 软件进行分析比对。

1.6 ALS 活性测定

取冻存的不同处理水稻植株叶片各 0.4 g, 分别加入 1.2 mL ALS 提取液(含 100.0 mmol/L 磷酸缓

冲液、5.0 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L 焦磷酸硫酸胺素、1.0 mmol/L 二巯代苏糖醇, pH 7.8), 4 °C 研磨 10 min, 迅速将匀浆液转移至 2 mL 预冷离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液至新的 2 mL 预冷离心管中, 获得的粗酶液置于 4 °C 冰箱中保存。参照文献[19]的方法测定 ALS 活性: 在样品管中依次加入 750 μL 反应缓冲液(含 50 mmol/L 磷酸缓冲液、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L 焦磷酸硫酸胺素, pH 7.0), 3.6 mol/L 丙酮酸钠 50 μL, 粗酶液 100 μL。对照管中依次加入 800 μL 反应缓冲液、3 mol/L H₂SO₄ 50 μL 和粗酶液 100 μL。混匀后置于 37 °C 水浴 1 h。然后在样品管中加入 3 mol/L H₂SO₄ 50 μL, 60 °C 孵育 15 min。最后各管依次加入 0.83 g/L 肌酸 500 μL 和 8.3 g/L 1-萘酚 500 μL, 混匀后 60 °C 水浴 15 min, 37 °C 水浴 15 min。再 5 000 r/min 离心 6 min, 以空白管作为空白对照组, 吸取各样品管的上清液用酶标仪测定 530 nm 波长下吸光值。以乙偶姻作为标准品, 按照对照处理的方法构建标准曲线, 根据标准曲线计算 ALS 活性。总蛋白含量用 BCA 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司产品]测定。

1.7 叶绿素总含量的测定

取不同除草剂处理后 14 d 的水稻叶片, 参照李得孝等^[23]的混合液浸提法测定叶片叶绿素总含量: 首先准确称量水稻叶片 50 mg, 将叶片剪碎后放入 20 mL 体积比 1:1 的丙酮与无水乙醇混合液中, 置于黑暗条件下浸提至叶片完全脱绿变白, 中间混匀 2~3 次。以丙酮与无水乙醇混合液作为空白对照组, 利用酶标仪测定各浸提液在 645 nm 和 663 nm 波长下吸光值, 根据下式计算叶片叶绿素总含量^[24]:

$$\text{叶绿素总含量} = (8.04 \times OD_{663} + 20.29 \times OD_{645}) \times V/W \times 1000 \quad (1)$$

其中, V 为丙酮与无水乙醇混合液体积, W 为叶片鲜重, OD_{663} 为 663 nm 处的吸光度, OD_{645} 为 645 nm 处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 抗性材料的获得

使用 EMS 诱变连梗 15, 通过对 M₂ 代水稻喷洒有效成分 86.4 g/hm² 甲咪唑烟酸进行抗性筛选。喷洒甲咪唑烟酸 14 d 后, 抗性植株生长正常, 叶片绿色; 非抗性植株叶片发黄、枯萎, 生长停滞(图 1)。

连续自交 3 代后, 经甲咪唑烟酸除草剂处理后无性状的分离现象, 证明突变体具有稳定的遗传抗性。

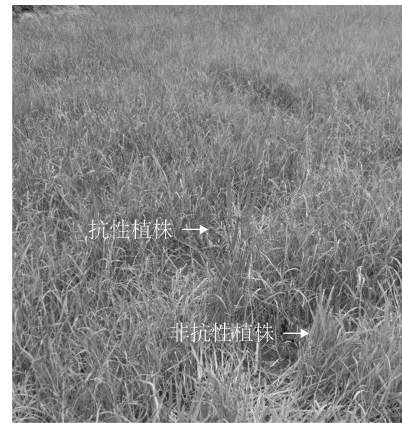


图 1 喷施甲咪唑烟酸后 14 d 的 M₂ 代抗性植株

Fig.1 The resistant plants in M₂ population at 14 d after spraying with imazapic

2.2 突变体和野生型水稻杂交后代的抗性分离

3 个杂交组合 F₂ 代植株喷施甲咪唑烟酸处理后 14 d, 各材料抗性植株与非抗性植株数量统计结果如表 1 所示。从表中可以看出, 嘉花与突变体杂交 F₂ 代中, 总共有 142 株正常生长, 有 50 株死亡; 淮稻 5 号与突变体杂交 F₂ 代中, 总共有 143 株正常生长, 有 49 株死亡; 苏秀 867 与突变体杂交 F₂ 代中, 总共有 146 株正常生长, 有 46 株死亡。3 个 F₂ 代抗性植株与非抗性植株的比例均约为 3:1, 用 3 个杂交组合嘉花×突变体、淮稻 5 号×突变体、苏秀 867×突变体 F₂ 代群体的抗性株数与感性株数进行卡方检验, χ^2 分别为 0.111、0.028、0.111, 均低于 $\chi^2_{0.05}(3.841)$, 说明本研究得到的抗性突变体受显性单基因控制, F₂ 群体单性状分离比满足 3:1 的规律。

表 1 杂交组合 F₂ 代水稻抗性分离

Table 1 Resistance segregation in F₂ hybrid combination

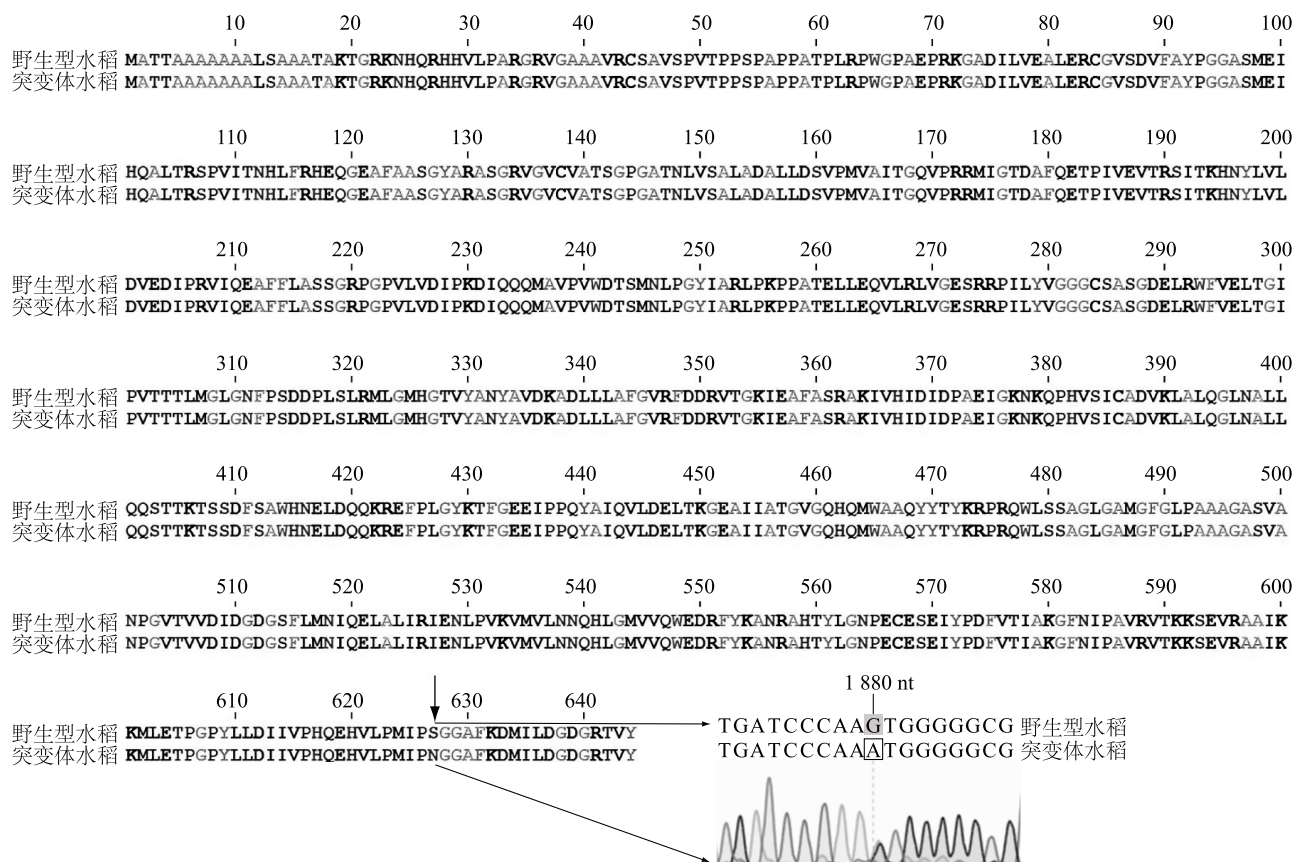
组合	抗性株数	非抗性株数	总株数	卡方值	P 值
嘉花×突变体	142	50	192	0.111	<0.05
淮稻 5 号×突变体	143	49	192	0.028	<0.05
苏秀 867×突变体	146	46	192	0.111	<0.05

2.3 ALS 基因序列

野生型和突变体 ALS 基因克隆结果表明, 水稻 ALS 基因是由单一的外显子组成, 内部没有内含子

区域,基因全长2 352 bp,编码序列(CDS)全长1 935 bp,编码 644 个氨基酸。突变体和野生型的核苷酸序列和氨基酸序列比对分析发现,突变体 ALS 基因

核苷酸序列在第1 880位的碱基由 G 突变为碱基 A, ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸由丝氨酸突变为天冬酰胺(图 2)。



图中箭头处为 ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸。

图 2 野生型和突变体水稻材料 ALS 基因编码氨基酸序列比对

Fig.2 Pairwise alignment of amino acid sequences encoded by the ALS gene between wild-type and mutant rice materials

2.4 突变体水稻对不同 ALS 抑制剂类除草剂的抗性

喷施 5 种不同 ALS 抑制剂类除草剂后植株的表型如图 3 所示。从图中可以看出,喷施咪唑啉酮类除草剂甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸处理后 7 d,野生型植株均出现生长停滞、叶片和茎秆发黄等现象;处理后 14 d,野生型植株全部死亡(图 3A)。而喷施咪唑啉酮类除草剂甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸处理后 7 d 和 14 d,突变体植株都能保持正常生长(图 3B)。喷施磺酰脲类除草剂烟嘧磺隆处理后 7 d,野生型植株和突变体植株都出现生长停滞现象;处理后 14 d,野生型植株死亡,突变体植株出现叶片、茎秆发黄(图 3B)。同样,喷施同属于磺酰脲类除草剂的甲基二磺隆处理后 7 d

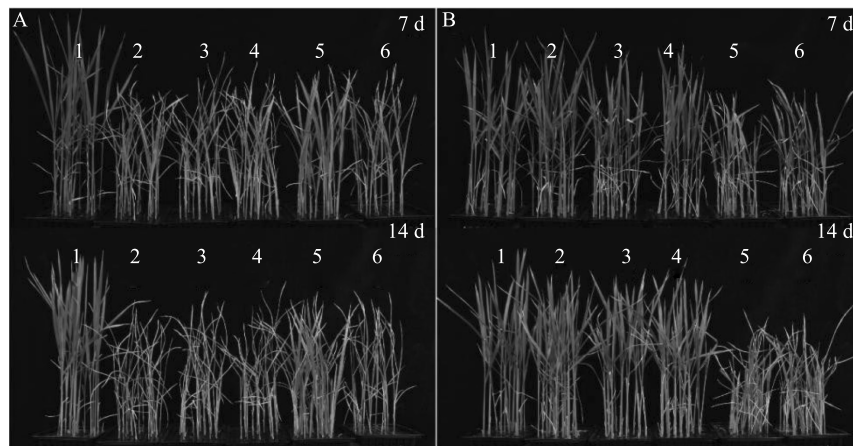
和 14 d,野生型植株和突变体植株均出现生长停滞,但处理后 14 d 植株未死亡,说明当前使用浓度的甲基二磺隆除草剂尚未能导致水稻植株死亡(图 3)。上述结果表明,水稻 ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸的突变会导致植株对甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸除草剂产生较强的抗性,而对甲基二磺隆和烟嘧磺隆除草剂的抗性相对较差。

2.5 ALS 活性

喷施 5 种不同 ALS 抑制剂类除草剂后 1 d 和 3 d,野生型和突变体叶片 ALS 活性如图 4 所示。从图中可以看出,野生型植株喷施 5 种不同除草剂后 1 d 和 3 d,植株叶片 ALS 活性均极显著低于喷施无菌水对照。喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸、甲基二磺隆、烟嘧磺隆后 1 d,野生型植株叶片 ALS

活性分别为喷施无菌水对照的 32.0%、36.1%、29.4%、61.3%、32.1%；喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸、甲基二磺隆、烟嘧磺隆后 3 d,野生型植株叶片 ALS 活性分别为喷施无菌水对照的 42.1%、36.5%、35.7%、63.2%、35.8%。突变体植株喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸后 1 d 和 3 d,植株叶片 ALS 活性与喷施无菌水对照无显著差异,而喷施甲基二磺隆、烟嘧磺隆后 1 d,叶片 ALS

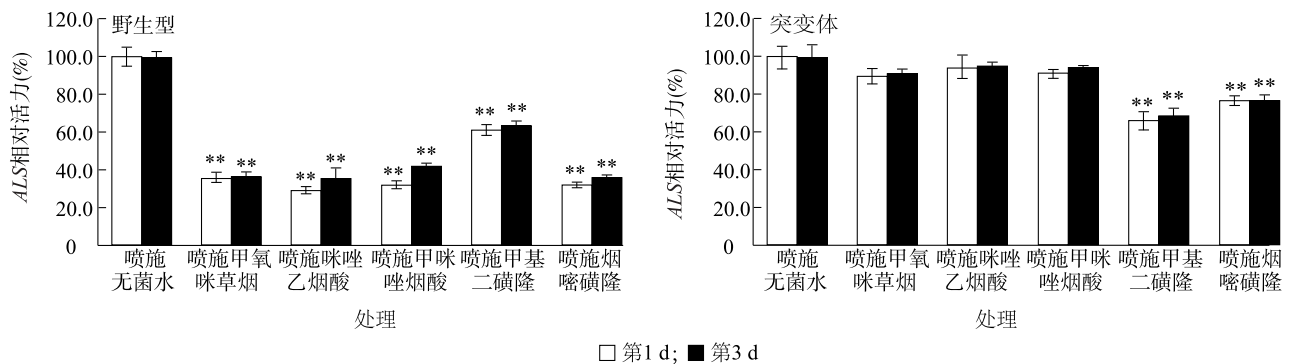
活性分别为喷施无菌水对照的 65.7%、76.9%,喷施甲基二磺隆、烟嘧磺隆后 3 d,叶片 ALS 活性分别为喷施无菌水对照的 69.0%、77.1%。上述结果说明,5 种 ALS 抑制剂类除草剂对野生型植株 ALS 活性均有较大影响,而喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸等除草剂对突变体植株 ALS 活性影响不大,喷施甲基二磺隆和烟嘧磺隆除草剂对突变体植株 ALS 活性有一定影响。



A:野生型水稻;B:突变体水稻;1:喷施无菌水处理;2:喷施甲氧咪草烟处理;3:喷施甲咪唑烟酸处理;4:喷施咪唑乙烟酸处理;5:喷施甲基二磺隆处理;6:喷施烟嘧磺隆处理。

图 3 野生型和突变体水稻材料喷施不同 ALS 抑制剂类除草剂后的表型

Fig.3 Phenotypes of wild-type and mutant rice materials after spraying different ALS-inhibiting herbicides



A:野生型;B:突变体。图柱上 ** 表示喷施除草剂处理与喷施无菌水对照差异极显著 ($P < 0.01$)。ALS 相对活力:喷施除草剂处理与喷施无菌水对照 ALS 活性比值。

图 4 喷施 5 种不同 ALS 抑制剂类除草剂对野生型和突变体叶片乙酰乳酸合成酶 (ALS) 活性的影响

Fig.4 Effects of spraying five different ALS-inhibiting herbicides on acetolactate synthase (ALS) activity in leaves of wild-type and mutant plants

2.6 水稻植株鲜重

喷施不同 ALS 抑制剂类除草剂后 14 d,野生型连梗 15 植株及突变体植株茎叶鲜重和根系鲜重如表 2 所示。从表中可以看出,喷施 5 种 ALS 抑制剂

类除草剂后,野生型植株茎叶和根系鲜重均显著低于喷施无菌水对照(CK)。其中,甲氧咪草烟处理后野生型的茎叶鲜重比 CK 减少 84.7%,咪唑乙烟酸处理后野生型植株根系鲜重比 CK 减少 81.3%。甲

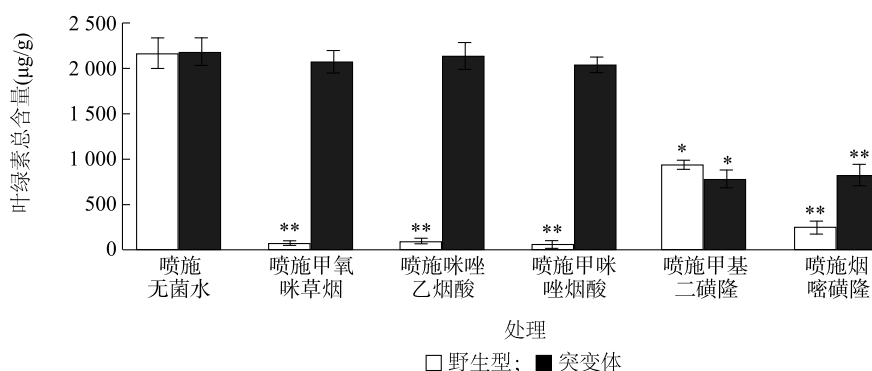
基二磺隆处理后野生型植株茎叶和根系鲜重分别比 CK 减少 51.7% 和 54.6%, 损失最小。喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸后, 突变体植株茎叶和根系鲜重与 CK 无显著差异; 喷施甲基二磺隆处理后, 突变体植株茎叶和根系鲜重分别比 CK 下降 54.1% 和 52.2%; 喷施烟嘧磺隆处理后, 突变体植株茎叶和根系鲜重分别比 CK 下降 47.5%、37.4%。上述结果说明, 使用当前浓度的 3 种咪唑啉酮类除草剂对突变体水稻的生长影响较小。因此, 利用该突变体可以在生产上培育一些抗咪唑啉酮类除草剂的水稻品种, 为水稻抗除草剂育种提供基础。

表 2 水稻茎叶和根系鲜重

Table 2 Fresh weight of rice shoots and roots

处理	野生型		突变体	
	单株茎叶鲜重 (mg)	单株根系鲜重 (mg)	单株茎叶鲜重 (mg)	单株根系鲜重 (mg)
喷施无菌水对照 (CK)	588a	260a	512a	230a
喷施甲氧咪草烟	90c	59c	493a	212a
喷施甲咪唑烟酸	96c	56c	450a	195a
喷施咪唑乙烟酸	95c	49c	454a	203a
喷施甲基二磺隆	284b	142b	235b	110b
喷施烟嘧磺隆	117c	50c	269b	144b

同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。



图柱上 **、* 分别表示喷施除草剂处理与喷施无菌水对照存在极显著差异 ($P < 0.01$) 和显著差异 ($P < 0.05$)。

图 5 喷施不同 ALS 抑制剂类除草剂对野生型连梗 15 和突变体叶片叶绿素含量的影响

Fig.5 Effects of spraying different ALS-inhibiting herbicides on chlorophyll content in leaves of wild-type Lianjing 15 and its mutants

3 讨论

目前, 植物对除草剂抗性机制大致可分为靶标抗性 (Target site resistance, TSR) 和非靶标抗性 (Non-target site resistance, NTSR) 两类^[14,25-27]。靶标抗性是通过靶标基因作用位点的突变阻止酶与除草剂的结合, 从而使植物对除草剂产生抗性^[28]。目前

2.7 叶绿素总含量

喷施不同 ALS 抑制剂类除草剂后 14 d, 野生型连梗 15 植株及其抗除草剂突变体植株叶片叶绿素总含量如图 5 所示。从图中可以看出, 喷施无菌水对照 (CK) 的野生型植株和突变体植株叶片叶绿素含量分别为 2 164 $\mu\text{g/g}$ 和 2 178 $\mu\text{g/g}$ 。喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸处理的野生型植株叶片叶绿素含量分别为 86 $\mu\text{g/g}$ 、112 $\mu\text{g/g}$ 和 71 $\mu\text{g/g}$, 均极显著低于 CK。喷施甲咪唑烟酸、甲氧咪草烟和咪唑乙烟酸处理的突变体植株叶片叶绿素含量分别为 2 075 $\mu\text{g/g}$ 、2 139 $\mu\text{g/g}$ 和 2 048 $\mu\text{g/g}$, 与 CK 无显著差异。喷施甲基二磺隆处理的野生型植株和突变体植株叶片叶绿素含量分别为 943 $\mu\text{g/g}$ 和 793 $\mu\text{g/g}$, 分别比 CK 下降 56.42% 和 63.59%。喷施烟嘧磺隆处理的野生型植株和突变体植株叶片叶绿素含量分别为 261 $\mu\text{g/g}$ 和 839 $\mu\text{g/g}$, 分别比 CK 下降 87.94% 和 61.48%。上述结果说明, 本研究构建的突变体植株叶片在喷施甲氧咪草烟、甲咪唑烟酸和咪唑乙烟酸处理后仍然保持较高水平的叶绿素含量, 而喷施甲基二磺隆和烟嘧磺隆处理均对突变体植株叶片叶绿素含量造成显著影响。

大多数 ALS 抑制剂类除草剂抗性材料都是通过诱导植物 ALS 基因中碱基突变而得到^[29-30]。本研究构建的突变体材料, 正是由于 ALS 基因碱基突变导致 ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸由丝氨酸突变为天冬酰胺而获得对咪唑啉酮类除草剂的抗性。本研究结果表明, 喷施咪唑啉酮类除草剂后的 1 d 和 3 d, 野生型植株 ALS 活性显著低于喷施无菌水对

照(CK),而突变体植株 ALS 活性与 CK 无显著差异,其原因可能是天冬酰胺比丝氨酸具有更大空间位阻,能阻止咪唑啉酮类除草剂与 ALS 结合,从而保持植物 ALS 活性及其合成支链氨基酸能力。

非靶标抗性的产生是通过减少除草剂吸收和转运、增强除草剂的植物体内代谢降解等方式来实现。这些过程通常与植物一些特定的基因家族相关^[31-32]。细胞色素 P450 单加氧酶基因 *CYP72A31*、*CYP81A6* 能提升拟南芥和水稻植株的代谢水平,从而加速植株吸收到体内的除草剂降解^[33-34]。谷胱甘肽 S-转移酶、葡萄糖基和芳基酰化酶以及其他转移酶等亦具有类似的功能^[26]。白苞猩猩草(*Euphorbia heterophylla* L.)突变体植株 ALS 基因碱基突变导致 ALS 蛋白氨基酸序列中第 653 个氨基酸(同水稻 ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸)由丝氨酸突变为天冬酰胺后,突变植株对咪唑啉酮类除草剂抗性比野生型植株提升约 16 倍;喷施甲氧咪草烟处理后 96 h,突变体植株和野生型植株体内的除草剂积累量无显著差异,但野生型植株根系和茎叶中除草剂含量占比为 30:70,而突变体根系和茎叶中除草剂含量占比为 76:24,这说明植物吸收的除草剂体内分配模式对植物的除草剂耐受性有较大影响^[35]。本研究虽然获得了对 ALS 抑制剂类除草剂抗性较好的水稻突变体材料,但其对除草剂的吸收、分配及体内降解机制尚有待进一步分析。

4 结论

本研究以连梗 15 为材料,利用 EMS 诱变和喷施甲咪唑啉酮类除草剂处理,筛选获得了可稳定遗传的抗性突变体材料。突变体 ALS 蛋白氨基酸序列中第 627 个氨基酸由丝氨酸突变为天冬酰胺。突变体对咪唑啉酮类除草剂有较强抗性,但对磺酰脲类除草剂抗性相对较差。

参考文献:

- [1] 唐成,陈露,安敏敏,等. 稻瘟病诱导水稻幼苗叶片氧化还原系统的特征谱变化[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):141-144.
- [2] 黎东升,曾靖. 经济新常态下我国粮食安全面临的挑战[J]. 农业经济问题,2015,36(5):42-47,110.
- [3] 陈晓锋,强胜,杨金玲,等. 江苏省杂草稻的传播与籼梗分化研究[J]. 中国水稻科学,2015,29(1):82-90.
- [4] 梁逸伦,郭水良,印丽萍. 上海地区杂草稻与水稻籽实形态差异比较研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2014,43(1):87-97.
- [5] KANAPECKAS K L, VIGUEIRA C C, ORTIZ A, et al. Escape to ferality; the endoferal origin of weedy rice from crop rice through de-domestication[J]. PLoS One,2016,11(9):e0162676.
- [6] CHAUHAN B S. Strategies to manage weedy rice in Asia[J]. Crop Protection,2013,48:51-56.
- [7] 王哲,戎俊,卢宝荣. 杂草稻的发生、危害与我国水稻生产面临的挑战[J]. 杂草科学,2015,33(1):1-9.
- [8] UMBARGER H E, BROWN B. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate[J]. The Journal of Biological Chemistry,1958,233(5):1156-1160.
- [9] CHIPMAN D, BARAK Z, SCHLOSS J V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids; acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1998,1385(2):401-419.
- [10] 梁五生,温雪玮,武斌,等. 一种利用乙酰乳酸脱羧酶催化脱羧测定乙酰乳酸合成酶活性的方法及应用:CN20161011777.5[P]. 2019-02-26.
- [11] 周焕斌,旷永洁,任斌,等. OsALS1 的定向突变及农作物内源基因定向进化的方法:CN202010048142.0[P]. 2021-04-13.
- [12] 辛洁,徐小博,王磊,等. ALS 抑制剂类除草剂的抗性研究概述[J]. 安徽农业科学,2019,47(4):18-21.
- [13] SHANER D L, ANDERSON P C, STIDHAM M A. Imidazolones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase[J]. Plant Physiology,1984,76(2):545-546.
- [14] YU Q, POWLES S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding[J]. Pest Management Science,2014,70(9):1340-1350.
- [15] RIAR D S, NORSWORTHY J K, SRIVASTAVA V, et al. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2013,61(2):278-289.
- [16] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annual Review of Plant Biology,2010,61:317-347.
- [17] GEALY R D, MITTEN H D, RUTGER N J. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): implications for weed management[J]. Weed Technology,2003,17(3):627-645.
- [18] 王芳权,杨杰,范方军,等. 水稻抗咪唑啉酮类除草剂基因 ALS 功能标记的开发与应用[J]. 作物学报,2018,44(3):324-331.
- [19] 陈天子,余月,凌溪铁,等. EMS 诱变水稻创制抗咪唑啉酮除草剂种质[J]. 核农学报,2021,35(2):253-261.
- [20] RAJGURU S N, BURGOS N R, SHIVRAIN V K, et al. Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr [J]. Weed Science,2005,53(50):567-577.
- [21] 毕俊国,谭金松,刘毅,等. 抗咪唑啉酮类除草剂水稻种质的筛选鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(4):804-808.

- [22] STEWART C N J, VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. *BioTechniques*, 1993, 14(5):748-750.
- [23] 李得孝,郭月霞,员海燕,等. 玉米叶绿素含量测定方法研究[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(6):153-155.
- [24] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 1949, 24(1):1-15.
- [25] 肖红辉,胡方宝,柯文. 除草剂百草唑通残留药害调查[J]. *河南农业*, 2015(9):28.
- [26] GAINES T A, DUKE S O, MORRAN S, et al. Mechanisms of evolved herbicide resistance [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(30):10307-10330.
- [27] 周佳伟,王歆凯,唐兆成,等. EMS 诱变的水稻不同位点突变体对 ALS 抑制剂类除草剂抗性差异[J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(7):1153-1160.
- [28] 安保光,欧阳超,赵惠敏,等. 植物 ALS 双位点突变基因、其编码蛋白及其应用;CN202311771814.0[P]. 2024-05-07.
- [29] BECKIE H J, TARDIF F J. Herbicide cross resistance in weeds [J]. *Crop Protection*, 2012, 35:15-28.
- [30] SUN Y W, ZHANG X, WU C Y, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(4):628-631.
- [31] 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 [J]. *Pest Management Science*, 2013, 69(2):176-187.
- [32] YUAN J S, TRANEL P J, STEWART C N. Non-target-site herbicide resistance: a family business [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(1):6-13.
- [33] PAN G, ZHANG X Y, LIU K D, et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6):933-943.
- [34] SAIKA H, HORITA J, TAGUCHI-SHIOBARA F, et al. A novel rice cytochrome P450 gene, *CYP72A31* confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3):1232-1240.
- [35] ROJANO-DELGADO A M, PORTUGAL J M, PALMA-BAUTISTA C, et al. Target site as the main mechanism of resistance to imazamox in a *Euphorbia heterophylla* biotype [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1):15423.

(责任编辑:石春林)