

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) 抑制剂类除草剂的抗性。本研究以野生型华航 31 (HH31)、耐咪唑啉酮除草剂水稻 *ALS*⁶²⁷ 突变体和甲基磺酸乙酯 (Ethyl Methyl Sulfone, EMS) 诱变的新型水稻突变体 *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指标来探究突变体 *ALS*¹⁷⁹ 的抗性。结果表明, 经过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。除了高浓度下的咪唑乙烟酸处理外, 其他处理条件下 *ALS*¹⁷⁹ 的酶活均高于野生型 HH31。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}

(¹ Longping Branch, College of Biology, Hunan University, Changsha 410125; ² State 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 seed coating 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 *ALS*¹⁷⁹ were higher than those of wild-type HH31 under all treatment conditions except for imazethapyr treatment at high concentrations. Collectively, we found that the Ala179Val mutation conferred broad-spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides and provided genetic germplasm resources for 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, 对水稻造成显著的植株损害以及产量损失^[1]。随着中国劳动力成本的增加, 劳动力从农村流向城市, 中国的水稻种植逐渐从密集细致的移栽转变为轻简栽培, 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

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

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@hhrrc.ac.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: Supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-01-14)

损害作物的情况下选择性地杀死杂草。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,通过培育抗除草剂水稻等作物和用除草剂包衣种子方法可以有效地防除杂草而不伤害农作物及通过杀除自交不育系等种苗来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(phosphinothricin acetyl transferase, PAT)的吸湿链霉菌基因转化进水稻创制的抗草甘膦抗性水稻 Liberty Link^[12],以及通过替换 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)的内源基因获得的草甘膦抗性水稻^[13]。但转基因水稻暂时在我国尚未获准大面积推广种植。前人还通过理化诱变方法获得了一些除草剂抗性水稻,如抗乙酰辅酶 a 羧化酶(ACCCase)水稻、对原卟啉原 IX 氧化酶(PPX)抑制剂除草剂的抗性水稻、抗咪唑啉酮(Clearfield)、抗精喹禾灵(Provisia)的水稻以及邓兴旺团队利用 EMS 诱变培育出具有多种优良性状的抗除草剂水稻品种(洁田稻 001)^[14-19]。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* 可以赋予对 4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD)除草剂的抗性^[20]。

乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase, ALS)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^[21]。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^[18]。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)^[22]。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^[23-26]。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^[27]。但咪唑啉酮类除草剂(如咪唑乙烟酸)在土壤残留较长,发掘对 ALS 类除草剂具有广谱抗性,特别是对其中具相对短残留特性的除草剂的抗性水稻品系,未来可能用于大田生产或者通过包衣实现种子保纯。

本研究小组前期通过 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; 发现其中, *ALS*¹⁷⁹ 是一个新的突变位点。本研究在对其进行分子特征鉴定的基础上,对 *ALS*¹⁷⁹ 进一步通过除草剂包衣浸种鉴定、苗期喷施实验以及相关酶活检测,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,以期 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

本研究供试材料为经 EMS（甲基磺酸乙酯）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 HH31 为对照。

1.2 *ALS*¹⁷⁹KASP 分子标记的开发

根据 *ALS*¹⁷⁹ 第 536 位碱基突变位点设计 PCR 扩增 KASP 分型引物，包括特异性正向引物 F1：5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTATGGGCGTCTCCTGGAAGG-3'和 F2：5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTATGGGCGTCTCCTGGAAGA-3'以及通用反向引物 179-R：5'-CGCATGATCGGCACCGAC-3'。正向特异性引物 F1 的 5'端包括 FAM 荧光信号标签 5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3'；正向特异性引物 F2 的 5'端包括 HEX 荧光信号标签 5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'。通过杂交将 *ALS*¹⁷⁹ 优异等位变异导入杂交稻亲本华占中，并利用开发的 KASP 标记分析 F₂ 群体分离情况。

1.3 不同种类 ALS 除草剂模拟包衣浸种实验

挑取籽粒饱满的 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（1X）配置好 5 个梯度（1X、5X、10X、20X、30X）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，放置在 37°C 恒温培养箱中催芽过夜，播种。待水稻培养约 10d 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。包衣除草剂溶液种类及推荐浓度配置详见表 1。

表 1 包衣除草剂种类及推荐浓度

Table 1 Types and recommended concentrations of coating herbicides

除草剂类别	除草剂	除草剂包衣浓度（1X）
Herbicide Category	Herbicide	Herbicide coating concentration(1X)
SU	10%苯磺隆（可湿性粉剂）	17.50 mg/L
IMI	苄草净（5%咪唑乙烟酸水剂）	0.60 mL/L
PTB	双草醚（灵跃®15%悬浮剂）	0.50 mL/L
TP	啶磺草胺（优先®4%可分散油悬浮剂）	0.60 mL/L 本+0.80 mL/L 助
SCT	氟唑磺隆（10%可分散油悬浮剂）	0.14 mL/L

1.4 4 种 ALS 类除草剂苗期喷施实验

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 RDN 人工气候箱中培养，培养条件：白昼温度 28°C，白昼时间 14h，相对湿度 70%，光照强度 43000lx；夜间温度 26°C，夜间时间 8h，相对湿度 65%，光照强度 00000lx。将三种水稻培养至两叶一心期（约 15d），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，

喷施浓度为大田推荐浓度下的 1X、5X、10X、20X、30X。在处理后的第 0d、15d、25d 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。

表 2 4 种 ALS 类代表性除草剂喷施推荐浓度及稻田土壤消解半衰期

Table 2 Recommended concentration of 4 types of ALS-inhibiting herbicides for spraying and half-life of soil digestion

除草剂	除草剂类别	大田推荐浓度 (1X)	土壤消解半衰期 (d)	参考文献
Herbicide	Herbicide Category	Recommended concentration for large fields (1X)	Half-life of soil digestion (d)	Reference
苯磺隆	SU	17.50 mg/L	8.61-10.34	[28]
咪唑乙烟酸	IMI	0.60 mL/L	25.66-133.29	[29]
双草醚	PTB	0.50 mL/L	1.6-4.3	[30]
啶磺草胺	TP	0.60 mL/L 本+0.80 mL/L 助	2-13	[31]

1.5 不同除草剂不同浓度下水稻 ALS、POD、SOD、CAT 酶活性质的测定

采用整株测定法测量水稻的各项酶活指标^[32]。选取经不同 ALS 类除草剂处理的 HH31 和 *ALS¹⁷⁹* 在处理后的 24h 进行乙酰乳酸合酶 (ALS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 的活性测定, 三次生物学重复。

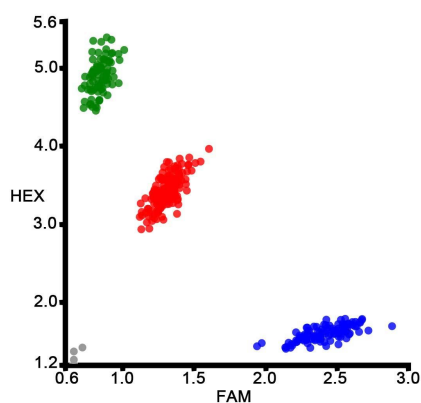
1.6 数据收集与分析

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 *ALS¹⁷⁹* 突变体 KASP 分子标记的开发

根据 *ALS¹⁷⁹* 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, 其中绿色、红色、蓝色和灰色分别代表纯合突变基因型 (TT)、杂合基因型 (CT)、野生型基因型 (CC) 和阴性对照 (图 1)。进一步表型鉴定表明此标记与除草剂抗性共分离, 即携带 *ALS¹⁷⁹* 纯合突变的植株表现出对咪唑啉酮类 (IMI) 除草剂抗性。



绿色代表纯合突变基因型 (TT), 红色代表杂合基因型 (CT), 蓝色代表野生型基因型 (CC), 灰色代表阴性对照

Green represents pure mutant genotype (TT), red represents heterozygous genotype (CT), blue represents wild-type genotype (TT), and gray represents negative control

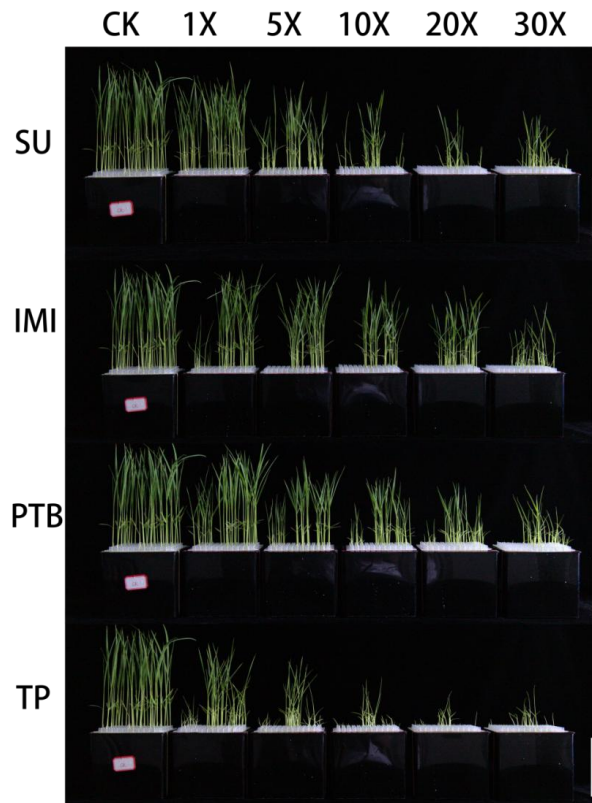
图1 KASP 标记鉴定 F₂ 代分离群体 (基于 *ALS* 基因外显子第 536 位的 SNP C-T)

Fig.1 KASP marker identification of F₂ generation segregating populations (based on SNP C-T at exon 536 of the *ALS* gene)

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 类除草剂进行包衣实验, 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, 本实验利用这 4 种 ALS 类除草剂进行模拟除草剂包衣梯度浸种。当培养 10d 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。纵向比对 *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。此外, 在 4 种除草剂处理下对 *ALS*¹⁷⁹ 和 *ALS*⁶²⁷ 的组内比较发现, 在 10X 苯磺隆、10X 双草醚以及 5X 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 30X 浓度处理下会稍弱于 *ALS*⁶²⁷, 说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, 植株长势虽都会受到不同程度的抑制但要明显强于野生型 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, 而咪唑乙烟酸下两种抗性材料的抗性水平基本相同 (图 2)。



SU: 苯磺隆; IMI: 咪唑乙烟酸; PTB: 双草醚; TP: 啶磺草胺, 96 孔播种板含三种水稻 (左侧 HH31、中间 *ALS*¹⁷⁹、右侧 *ALS*⁶²⁷), 比例尺 10 cm

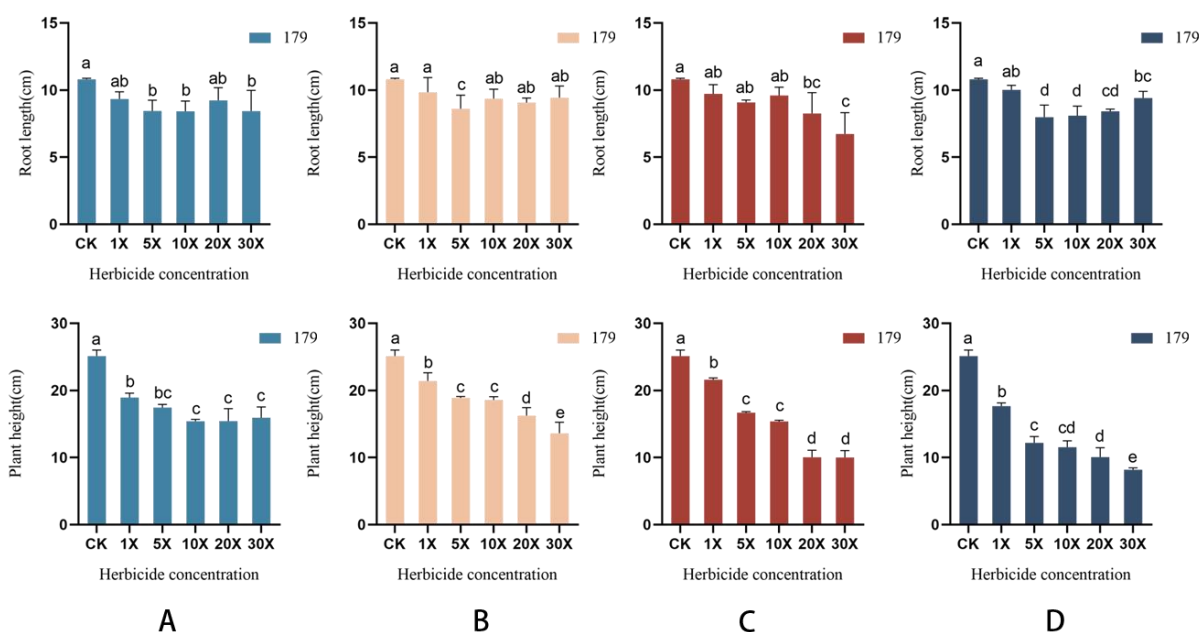
SU: Tribenuron-methyl; IMI: Imazethapyr; PTB: Bispyribac-sodium; TP: Pyroxulam. There are three types of rice on the 96-well seeding plate (left HH31, middle ALS^{179} , right ALS^{627}), The scale is 10 cm

图2 不同种类不同浓度 ALS 类除草剂包衣幼苗张势

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^{179} 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^{179} 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， ALS^{179} 根长和株高总体均存在显著性差异，表明在进行除草剂包衣浸种后会对 ALS^{179} 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^{179} 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^{179} 根系长度虽短于清水下 ALS^{179} ，但彼此之间无显著性差异。表明在进行除草剂包衣浸种后对 ALS^{179} 地上部的抑制强于地下部（图 3）。



A: 苯磺隆; B: 咪唑乙烟酸; C: 双草醚; D: 啶磺草胺; 不同字母在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 下同

A: Tribenuron-methyl; B: Imazethapyr; C: Bispyribac-sodium; D: 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} 根系长度与植株高度分析

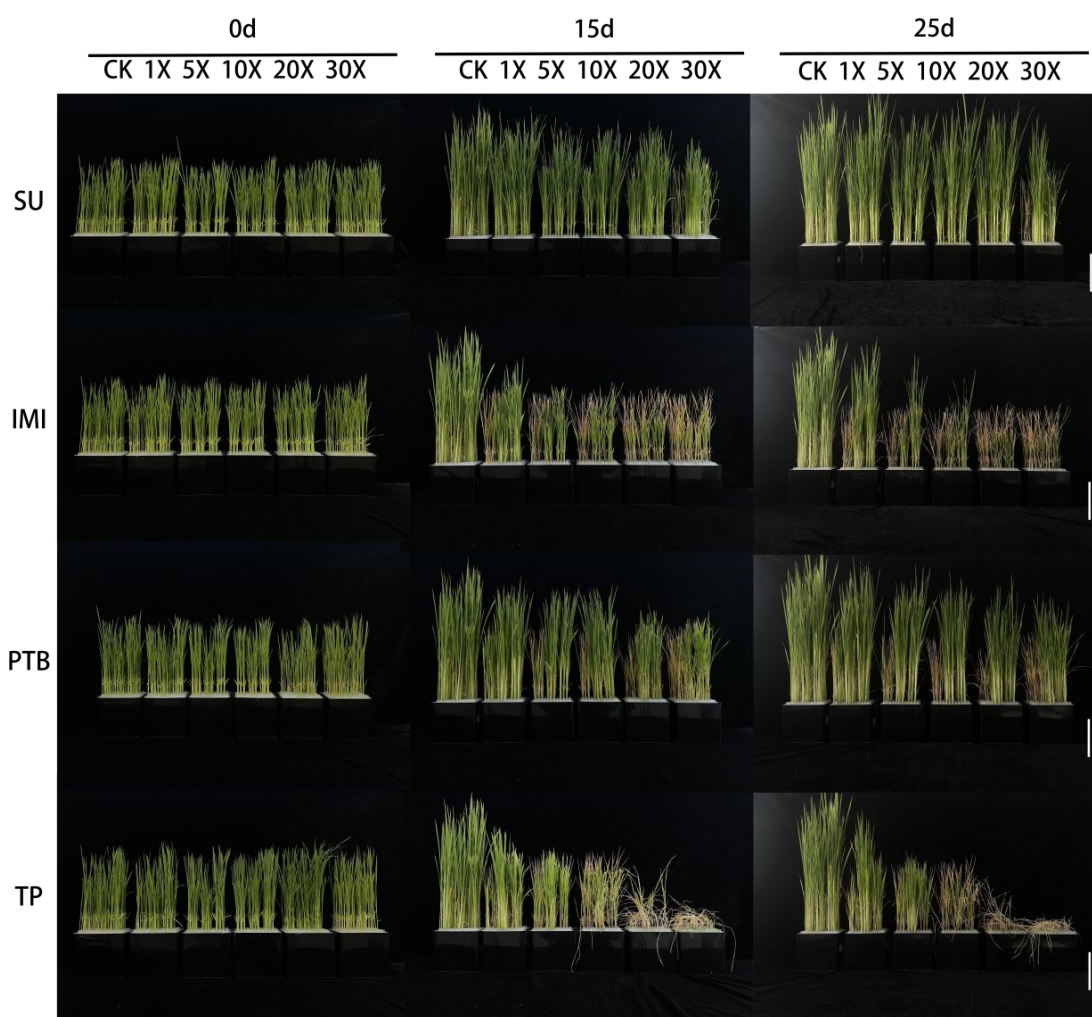
Fig.3 Analysis of root length and plant height of ALS^{179} under different herbicide treatments

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

待三种水稻培养至两叶一心期时，对三种水稻（左侧 HH31，中间 ALS^{179} ，右侧 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 15d 可以发现，与 ALS^{179} 和 ALS^{627} 相比 HH31 生长受到较强抑制，处理 25d 后，三个品种均可正常生长，在 1X, 5X 浓度时，HH31 长势与 ALS^{179} 基本相同；但在 30X 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^{179} 。在咪唑乙烟酸梯度处理 15d 后，1X 和 5X 条件下 HH31 开始叶片发黄，而 ALS^{179} 和 ALS^{627} 仍能正常生长，在处理 25d 后无论在何种梯度下，HH31 均发黄枯死，而 ALS^{179} 和 ALS^{627} 在 1X 和 5X 仍能存活，且 ALS^{627} 的高度明显高

于 *ALS*¹⁷⁹。在双草醚梯度处理 15d 后, HH31 从 5X 浓度处理下叶片开始发黄, 而 *ALS*¹⁷⁹ 和 *ALS*⁶²⁷ 仍能正常生长, 在处理第 25d 发现, 在 1X 浓度处理下 HH31 的生长受到一定抑制, 在 5X 以上的浓度处理条件下 HH31 叶片发黄或植株枯死, 而 *ALS*¹⁷⁹ 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 15d 发现 10X 以上的三个品种均死亡, 处理第 25d, 三种水稻基本枯死, 而较低浓度的 1X 和 5X 条件下三种水稻仍能存活, 但 1X 条件下 *ALS*¹⁷⁹ 的株高明显强于 HH31 和 *ALS*⁶²⁷。由此可见, 经梯度喷施 25d 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 30X 苯磺隆以及 1X 啶磺草胺处理下 *ALS*¹⁷⁹ 抗性强于 *ALS*⁶²⁷; 在 5X 咪唑乙烟酸处理时, *ALS*¹⁷⁹ 抗性要弱于 *ALS*⁶²⁷; 而在五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。



SU: 苯磺隆; IMI: 咪唑乙烟酸; PTB: 双草醚; TP: 啶磺草胺, 比例尺 10 cm

SU: Tribenuron-methyl; IMI: Imazethapyr; PTB: Bispyribac-sodium; TP: Pyroxsulam. The scale is 10 cm

图 4 三种水稻对不同 ALS 类除草剂的抗性鉴定

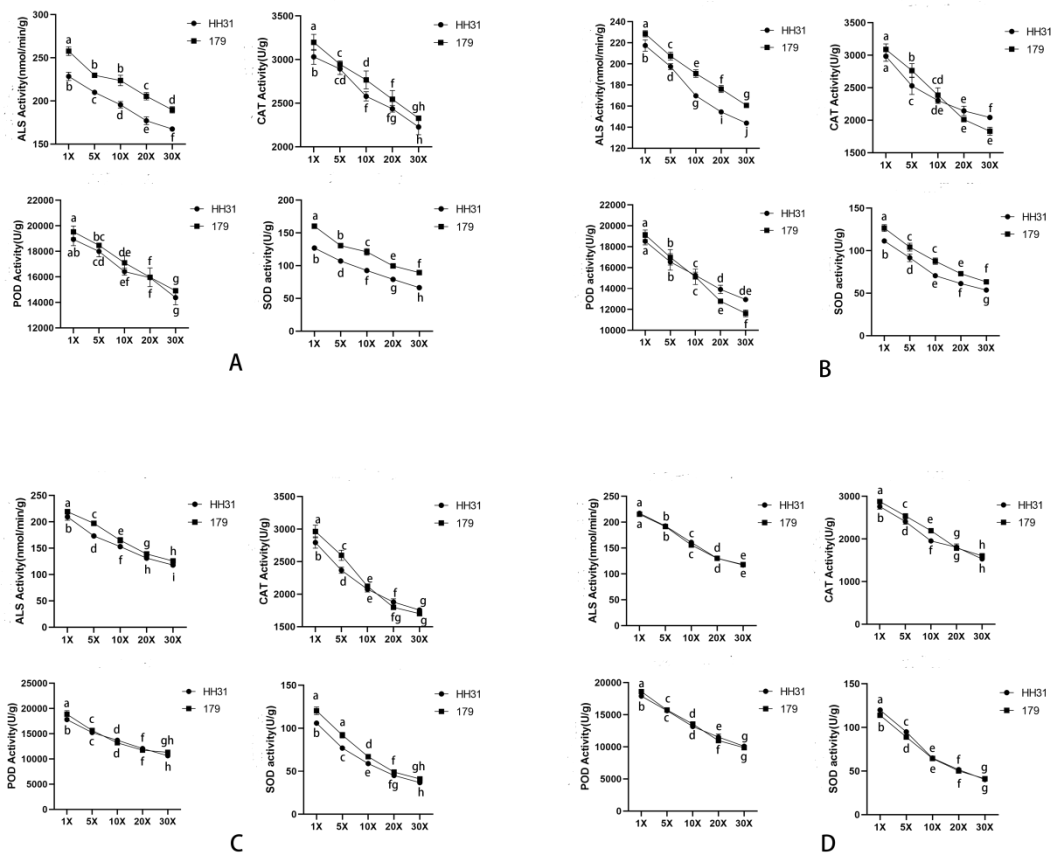
Fig.4 Identification of resistance of three rice varieties to different ALS herbicides

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 24h 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 *ALS¹⁷⁹* 的 ALS 酶活性快速下降且趋势基本一致，表明抗性突变体 *ALS¹⁷⁹* 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。

此外，随着除草剂浓度的不断提高，HH31 和 *ALS¹⁷⁹* 的各种保护酶的活性也呈现下降趋势。但总体来看经过苯磺隆处理后 *ALS¹⁷⁹* 的各项酶活性仍然高于野生型 HH31，表明 *ALS¹⁷⁹* 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，*ALS¹⁷⁹* 的 SOD 酶活性整体均高于 HH31，但在 20X 和 30X 下 CAT、POD 的酶活却低于 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，在双草醚处理时发现 *ALS¹⁷⁹* 的 CAT，SOD 酶活普遍高于野生型 HH31 且在 1X 和 5X 处理下呈显著性差异，但是在高浓度的 20X 和 30X 处理时差异不显著；*ALS¹⁷⁹* 的 POD 虽总体高于 HH31，但除了 1X 下差异显著，其他处理浓度下均不存在显著性差异。类似的，在啶磺草胺处理时发现 *ALS¹⁷⁹* 的各项保护酶的酶活虽总体高于 HH31，但仅在较低浓度下差异显著，其他酶活在所有处理浓度下均不存在显著性差异。



A: 苯磺隆; B: 咪唑乙烟酸; C: 双草醚; D: 啶磺草胺

A: Tribenuron-methyl; B: Imazethapyr; C: Bispyribac-sodium; D: Pyroxsulam

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

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 诱变获得的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 1X 推荐浓度下可保持植株正常生长，在浓度高达 30X 的苯磺隆和双草醚处理下也无明显药害反应。为此，我们认为 *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实验发现，*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 30X 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（咪唑乙烟酸）残留周期时间短，除草效率高的除草剂，例如 SU 类（苯磺隆）、PTB 类（双草醚）、TP 类（啶磺草胺）等。若用这些类型除草剂与 Ala179Val 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，导致作物受损影响产量。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实验测定了 *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]。本实验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ALS¹⁷⁹的SOD、CAT、POD酶活也随之不断降低，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，ALS¹⁷⁹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，ALS¹⁷⁹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10X以上的咪唑乙烟酸处理时，ALS¹⁷⁹体内SOD酶活性虽高于HH31，但CAT、POD的酶活却低于HH31，这可能是处理浓度过高，使得ALS¹⁷⁹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]。

总之，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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 1999, 23(1): 47-49
- [5] Green J M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops[J]. 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*)[J]. 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[J]. 科学通报, 2016, 61(35): 3761-3769
Mou T M. The research progress and prospects of two-line hybrid rice in China[J]. 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[J]. 杂交水稻, 1997, 12(5): 1-3
Xiao G Y. The View of Crop Herbicide Resistance for Heterosis Utilization[J]. Hybrid Rice, 1997, 12(5): 1-3
- [9] 温莉娴, 周菲, 邹玉兰. 抗除草剂转基因水稻的研究进展[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. *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[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(10): 1624-1633
- [12] Vermij P. Liberty Link rice raises specter of tightened regulations[J]. *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[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16139
- [14] Hinga M, Griffin S, Moon S M, Rasmussen R D, Cuevas F. Methods and compositions to produce rice resistant to ACCase inhibitors, WO patent, WO2013016210, 2013
- [15] 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[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5781
- [16] Tan S, Evans R R, Dahmer M L, Singh B K, Shaner D L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future[J]. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 2005, 61(3): 246-257
- [17] 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[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(2): 348-355
- [18] Jin M, Chen L, Deng X W, Tang X Y. Development of herbicide resistance genes and their application in rice[J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(1): 26-35
- [19] 刘定富, 尹合兴, 应继锋. 中国水稻百年育种的一些关键基因[J]. 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[J]. *China Rice*, 2022, 28(2): 1-11
- [20] 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[J]. *Science*, 2019, 365(6451): 393-396
- [21] Yu Q, Powles S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding[J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1340-1350
- [22] Garcia M D, Nouwens A, Lonhienne T G, Guddat L W. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(7): E1091-E1100
- [23] 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[J]. 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[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 890-899
- [24] 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*)[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(12): 2538-2543
- [25] 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[J]. *Genome Biology*, 2020, 21 (1): 1-11
- [26] 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[J]. *Plos one*, 2020, 15(9): e0227397
- [27] 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
- [28] 杜慧平, 杜慧玲. 苯磺隆在土壤中的消解动态和残留测定[J]. 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[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*,

2015, 43(1): 50-53

- [29] 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[D]. 贵州大学, 2020
Huang W Y. Establishment of Rapid Detection Methods and Degradation Models of Pesticide Residues in Typical Soils in China[D]. Guizhou University, 2020
- [30] 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氰氟草酯和双草醚残留[J]. 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[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(3): 691-694
- [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[J]. 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[J]. 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-rape rotation field[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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.)[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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.) Acta Ecologica Sinica, 2008, (3): 1098-1103
- [41] 马春英. 不同品种谷子对单啶磺隆和扑草净耐药性差异的生理机制[D]. 山西农业大学, 2021
Ma C Y. Physiological Resistance Mechanism of Foxtail Millet with Different Herbicide-Resistance to Monosulfuron and Prometryn[D]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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 differing in salt tolerance[J]. 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[J]. 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[J]. Chemical Enterprise Management, 2021(1): 92-93