

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.04.002

2 种药剂对水稻愈伤组织分化的影响及分化苗抗除草剂鉴定

程正宵^{1,2}, 李杰勤^{1,2*}, 钱晶晶¹, 唐靖雯¹, 张从宇¹

(1. 安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 安徽省饲草生物育种国际合作研究中心, 安徽 凤阳 233100)

摘要: [目的] 通过对水稻愈伤组织进行化学诱变与除草剂筛选, 鉴定具有抗除草剂的水稻新种质资源和乙酰乳酸合成酶(ALS)基因新位点。[方法] 研究了诱变剂叠氮化钠(NaN_3)和除草剂甲氧咪草烟对水稻愈伤组织诱导分化的影响, 并对分化苗进行了除草剂抗性鉴定和分子鉴定。[结果] NaN_3 处理后可提高愈伤组织在甲氧咪草烟处理下的分化率, 且在 0.005 g/L 甲氧咪草烟溶液、2 mmol/L NaN_3 溶液处理下, 愈伤组织分化率最高, 其分化率为 33.30%。利用不同质量浓度的甲氧咪草烟溶液对分化苗进行筛选, 在田间推荐剂量 1 倍(3.16 g/L)和 2 倍(6.32 g/L)质量浓度甲氧咪草烟溶液喷施下均有分化苗存活, 且在 2 倍处理下存活率达到 20%。对抗性苗进行重测序表明, ALS 基因第 199 位的碱基 C 突变为 A, 导致第 67 位氨基酸由脯氨酸变为苏氨酸。[结论] 利用 NaN_3 及甲氧咪草烟筛选可以获得抗甲氧咪草烟水稻新种质, 并且获得的 Pro67Thr 的突变为水稻抗甲氧咪草烟育种新位点, 这为抗除草剂诱变育种研究提供了种质资源和基因资源。

关键词: 水稻; NaN_3 ; 甲氧咪草烟; 分化; 分子鉴定; 愈伤组织; 抗除草剂

中图分类号: S511 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)04-0012-08

Effects of Two Chemicals on the Differentiation of Rice Callus and Identification of Herbicide Resistance of the Differentiated Seedlings

CHENG Zhengxiao^{1,2}, LI Jieqin^{1,2*}, QIAN Jingjing¹, TANG Jingwen¹, ZHANG Congyu¹

(1. College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China; 2. Anhui International Cooperative Research Center for Forage Bio-breeding, Fengyang 233100, Anhui, China)

Abstract: [Objective] Rice callus were screened by chemical mutagenesis and herbicide, and new rice germplasm resources with herbicide resistance and new loci of acetolactate synthase (ALS) gene were identified. [Method] In this study, the effects of sodium azide (NaN_3) and imazamox on the differentiation of rice callus were analyzed. And the herbicide resistance identification and molecular identification were performed the differentiated seedlings. [Result] The NaN_3 treatment could increase the differentiation rate when the medium was added NaN_3 . The highest differentiation rate was 33.30% on the treatment of 0.005 g/L imazamox solution and 2 mmol/L NaN_3 solution. The differentiated seedlings were screened using different concentrations of imazamox. The differentiated seedlings were sprayed with 1 times (3.16 g/L) and 2 times (6.32 g/L) concentration of imazamox, and their survival rate reached 20% under the treatment of twice the recommended concentration. It proved that these survived seedlings had resistance to imazamox. The resistant seedlings were sequenced by second generation sequencing. It showed that the base C was mutated to A at position 199 of the ALS gene, resulting in a change from proline to threonine at the position. [Conclusion] New rice germplasm resistant to

收稿日期: 2024-11-09

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划(202204c06020069)。

作者简介: 程正宵(1998—), 男, 河南濮阳人, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种, e-mail: czx04111998@163.com。

*通信作者: 李杰勤(1980—), 男, 四川屏山人, 教授, 博士, 研究方向: 作物遗传育种, e-mail: wlhljq@163.com。

imazamox were obtained. The mutation of Pro67Thr is a new resistant locus to imazamox. Our research provides germplasm resources and genetic resources for the study of rice herbicide-resistant mutagenesis breeding.

Keywords:rice; NaN_3 ; imazamox; differentiation; molecular identification; callus; herbicide resistance

0 引言

水稻(*Oryza sativa* L.)是中国和全球重要的粮食作物之一,供养了超过一半的全球人口。为了满足日益增长的粮食需求,提高水稻的产量、稳定性和质量是种植水稻的关键目标^[1]。然而,随着耕种面积的扩大,杂草问题日益严重,杂草的生长对水稻的产量和品质造成了显著影响^[2]。因此,除草剂的使用成了控制杂草的常见手段,而抗除草剂水稻的培育逐渐成为研究热点^[3]。

诱变育种技术通过人为诱导突变,加速变异的发生,能够有效地获得新的遗传变异^[4]。化学诱变剂如甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)是常见的诱变剂,但其诱变周期较长,且难以有效控制变异的方向和性质。相比之下,叠氮化钠(NaN_3)是一种点诱变剂,因其仅作用于DNA复制期,在组织培养中加入培养基后,能够高效地诱发基因突变。 NaN_3 具有使用简便、高效、无残留、成本低廉等优势^[5-8]。自从1965年Spence^[9]首次发现 NaN_3 对大麦的诱变作用以来,许多国内外研究人员开始广泛研究 NaN_3 在作物中的应用。

目前,在水稻抗除草剂研究中,利用化学诱变来获得抗除草剂水稻已经有多个成功报道。宋鹏等^[10]通过诱变筛选水稻种子,发现了4株对咪唑乙烟酸具有抗性的水稻植株。咪唑啉酮类除草剂如甲氧咪草烟(imazamox)具有广谱、高效等特点,已成为大豆田的主要除草剂,并被应用于水稻田中杂草的防除工作中^[11]。在抗咪唑啉酮类除草剂的水稻中,由于乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthetase, ALS)基因的突变,导致酶的结构发生变化,进而降低了水稻对咪唑啉酮类除草剂的敏感性。不同位点的ALS基因突变会产生不同水平的抗性^[12-13]。王

芳权等^[14]通过筛选水稻品种,发现了金粳818这一抗除草剂水稻品种,其ALS基因编码区第1880位的碱基由G突变为A,导致丝氨酸被天冬酰胺取代,从而获得其除草剂抗性。前人的研究主要是通过种子进行诱变,并对诱变的种子进行筛选,时间长、效率低。

本研究旨在通过诱变育种方法,选取成熟胚诱导的水稻愈伤组织作为外植体,使用不同浓度的 NaN_3 溶液处理后,将其接种到含有甲氧咪草烟溶液的培养基中,并通过组培诱导愈伤组织的分化;再利用不同质量浓度的甲氧咪草烟溶液对幼苗进行喷施,分析其对除草剂的抗性水平,并通过分子鉴定筛选出突变位点,为水稻抗除草剂育种提供新的种质资源和基因资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料、主要试剂及仪器

供试水稻:‘润珠香占’品种,由湖北中香种业科技股份有限公司提供。

主要试剂:基因组DNA提取试剂盒(DP320-03,天根生化科技(北京)有限公司);N6培养基(C1416-1 L, Merck KGaA);2,4-D(D295, Phyto-Tech);维生素B1(VB1)(BS949-25 g, Biosharp);维生素B6(VB6)(40167562, 国药集团化学试剂有限公司);维生素B8(VB8)(BS175-100 g, Biosharp);6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)(HK0130036A, PhytoTech);激动素(KT)(BS960-1 g, Biosharp);萘乙酸(NAA)(N605, PhytoTech);琼脂(8211GR500, BioFROXX);蔗糖(10021418, 国药集团化学试剂有限公司)。

主要仪器:超净台(SW-CJ-1F, 苏州安泰空气技术有限公司);恒温振荡器(IS-RDD3, 苏州捷美电子有限公司);高压灭菌锅(HCE-50, HIRAYAMA);

离心机(5424R,艾本德国际贸易有限公司);电泳仪(PowerPac Basic, BIO-RAD);电泳槽(DYCP-31CN,北京六一仪器厂)。

1.2 试验步骤与方法

1.2.1 外植体消毒

挑选成熟饱满的水稻种子,经人工去壳后用自来水持续冲洗 50~60 min,将清洗过的水稻种子放入灭过菌的 50 mL 离心管中,加入 75% 乙醇没过种子,放入摇床,37 °C,220 r/min 振荡 5 min;然后拿至超净台中利用无菌水清洗 3 次;再拿出加入 0.1% HgCl₂+3 滴吐温 20 没过种子,放入摇床,37 °C,220 r/min 振荡 10 min;接着拿至超净台中利用无菌水清洗 5 次,直至无泡沫;再将成熟胚接种到愈伤组织诱导培养基中进行培养。

1.2.2 培养基、甲氧咪草烟溶液、NaN₃溶液的配制及愈伤组织培养条件

愈伤组织诱导培养基为 N6+2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L VB8+1 mg/L VB1+1 mg/L VB6+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖;分化与生根培养基均为 N6+1 mg/L 6-BA+1 mg/L KT+1 mg/L NAA+0.1 mg/L VB8+1 mg/L VB1+1 mg/L VB6+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖。

甲氧咪草烟溶液的配制:将甲氧咪草烟中加入不同量的蒸馏水,将其配制成 0.001、0.005、0.01、0.05 g/L 4 种质量浓度的溶液,过滤灭菌;NaN₃溶液的配制:NaN₃用蒸馏水配制成 1、2、3、4 mmol/L 4 种浓度的溶液,121 °C 湿热灭菌 20 min 冷却备用。

培养室温度(25±2)°C,愈伤组织诱导期间进行暗培养,分化苗诱导需要光培养,光照时间 16 h,黑暗 8 h,光照强度为 1.5~2.0 klx,相对湿度 60% 左右。

1.2.3 甲氧咪草烟对水稻幼胚愈伤组织致死浓度的筛选

将愈伤组织接种到含有不同质量浓度甲氧咪草烟(0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 g/L)溶液的愈伤组织诱导培养基中,每日观察愈伤变化情况。21 d 后统计成活率,愈伤全部死亡的最低质量浓度则为致

死浓度。

1.2.4 不同质量浓度 NaN₃溶液和质量浓度甲氧咪草烟溶液组合处理水稻愈伤组织

通过前期的预试验,初步确认了 NaN₃溶液浓度和甲氧咪草烟溶液质量浓度的范围。在此基础上,采用 2 因素 4 水平正交试验 L₁₆(4²)设计来优化 NaN₃溶液浓度和甲氧咪草烟质量浓度(表 1)。将诱导的愈伤组织分别在 1、2、3、4 mmol/L NaN₃溶液中浸泡 10 min,再用无菌水清洗 3~5 次,然后分别接种到含 0.001、0.005、0.01、0.05 g/L 质量浓度甲氧咪草烟溶液的愈伤组织诱导培养基中。35 d 后将处理的愈伤组织用清水冲洗掉表面残留的 NaN₃和甲氧咪草烟,接种至分化培养基中,35 d 后观察分化情况,计算分化率,并进行方差分析。

1.2.5 不同剂量甲氧咪草烟喷施处理

对在培养基内分化幼苗的水稻进行田间推荐

表 1 不同浓度 NaN₃溶液和质量浓度甲氧咪草烟溶液对愈伤组织的处理

处理组合	因素	
	NaN ₃ (A)浓度/ (mmol·L ⁻¹)	甲氧咪草烟(B)质量浓度/ (g·L ⁻¹)
A ₁ B ₁	1	0.001
A ₁ B ₂	2	0.001
A ₁ B ₃	3	0.001
A ₁ B ₄	4	0.001
A ₂ B ₁	1	0.005
A ₂ B ₂	2	0.005
A ₂ B ₃	3	0.005
A ₂ B ₄	4	0.005
A ₃ B ₁	1	0.01
A ₃ B ₂	2	0.01
A ₃ B ₃	3	0.01
A ₃ B ₄	4	0.01
A ₄ B ₁	1	0.05
A ₄ B ₂	2	0.05
A ₄ B ₃	3	0.05
A ₄ B ₄	4	0.05

剂量1倍剂量(3.16 g/L)与2倍剂量(6.32 g/L)甲氧咪草烟溶液的喷施,喷施15 d后与对照组材料对比观察是否具有对甲氧咪草烟的抗药性。

1.3 水稻DNA提取、ALS基因序列分析及分子验证

1.3.1 水稻基因组DNA的提取及检测

按照DNA提取试剂盒的说明书提取水稻基因组DNA。

将提取的水稻基因组DNA进行DNA浓度检测,合格后送深圳华大基因股份有限公司(简称华大基因)测序。

1.3.2 样品测序和ALS基因序列查找及分子验证

将样品送华大基因进行全基因组重测序后,将重测序数据与水稻*Oryza sativa* v7.0基因组进行比对,查看测序情况并查找与水稻抗ALS类除草剂相关基因。利用NCBI进行Blast比对,根据水稻基因组中的ALS基因(*LOC_Os02g30630*),获得水稻抗ALS类除草剂相关的ALS基因CT功能域所对应的

基因序列及氨基酸序列,利用Bio XM软件将测序结果与基因组数据进行多序列对比。

1.4 试验数据处理

整理数据采用Excel 2019软件,数据统计与分析采用SPSS 27.0和DPS软件。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度甲氧咪草烟溶液和浓度NaN₃溶液对愈伤组织的影响

为了筛选出甲氧咪草烟溶液致死浓度,将愈伤组织接种到含不同质量浓度(0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 g/L)甲氧咪草烟溶液的培养基中,共设计5组试验。当甲氧咪草烟溶液质量浓度为0.001 g/L时,愈伤组织成活率最高;当甲氧咪草烟溶液质量浓度达到0.05和0.1 g/L时,愈伤组织全部褐化死亡(表2)。因此,0.05 g/L为甲氧咪草烟溶液致死浓度。

表2 甲氧咪草烟致死浓度筛选

甲氧咪草烟溶液质量浓度/ (g·L ⁻¹)	愈伤组织		
	接种数/个	成活个数/个	成活率/%
0.001	10	8	80
0.005	10	5	50
0.01	10	3	30
0.05	10	0	0
0.1	10	0	0

将水稻愈伤组织分别用不同浓度的NaN₃溶液(A)处理后,接种至含不同质量浓度的甲氧咪草烟溶液(B)培养基中,培养35 d后(60 d时苗高达到7~8 cm),对其分化情况进行方差分析。结果(表3)显示,A因素间、B因素间及其交互作用(AB)差异均有高度统计学意义($P < 0.01$)。这表明,不同浓度的NaN₃溶液和质量浓度甲氧咪草烟溶液对水稻愈伤组织的分化具有显著影响,因此需要进一步探索最佳处理组合。

进一步分析了NaN₃和甲氧咪草烟的处理组合

表3 NaN₃和甲氧咪草烟对水稻愈伤分化率的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
A因素间	1 995.86	3	665.287 5	1 126.825	0.000 1
B因素间	1 424.57	3	474.855 8	804.283	0.000 1
A×B	995.98	9	110.663 9	187.436	0.000 1
误差	18.89	32	0.590 4		
总变异	4 435.30	47			

对分化率的影响。随着NaN₃溶液浓度和甲氧咪草烟溶液质量浓度的增加,分化率显著降低。当甲氧

咪草烟的质量浓度为 0.005 g/L 且 NaN_3 浓度为 2 mmol/L 时,愈伤组织的分化率显著高于其他处理组合,达到最高值 33.30%;而当甲氧咪草烟的质量浓度为 0.05 g/L 时,分化率降至最低,为 0%(表 4)。这表明,甲氧咪草烟质量浓度为 0.005 g/L 且 NaN_3 浓度为 2 mmol/L 时,愈伤组织成活率和分化率最高,推测该条件下的分化苗可能具有较强的抗性潜力。

2.2 分化苗的除草剂抗性鉴定

为了验证分化苗是否具有对甲氧咪草烟的抗性,对分化苗进行不同质量浓度甲氧咪草烟溶液的喷施,结果如表 5 所示。对照材料在喷施田间推荐剂量 1 倍的甲氧咪草烟溶液 15 d 后出现发黄萎蔫甚至死亡的现象,存活率为 0,表明对除草剂(甲氧咪草烟)无抗性;而处理材料 1 和 2 在喷施田间推荐剂量 1 倍和 2 倍的甲氧咪草烟溶液 15 d 后较为正常,其中,处理组喷施 1 倍田间剂量质量浓度除草剂的存活率为 80%,而喷施 2 倍田间剂量质量浓度除草剂的存活率为 20%。

2.3 抗甲氧咪草烟水稻植株的序列对比分析

对具有甲氧咪草烟抗性的水稻植株进行重测序分析,结果获得了 88 069 376 个 reads 和 26 420 812 800 个碱基,其中 GC 含量占总碱基的 42.39%;大于 Q20 质量标准的碱基平均识别率为 97.72%,大于 Q30 质量

表 4 NaN_3 和甲氧咪草烟对愈伤分化率的多重比较

NaN_3 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	甲氧咪草烟质量浓 度/(g·L ⁻¹)	分化率/%
1	0.001	10.00±1.13ef
2	0.001	27.77±1.16b
3	0.001	12.23±0.31d
4	0.005	4.43±0.17gh
1	0.005	16.67±0.39c
2	0.005	33.30±1.20a
3	0.005	11.10±0.79de
4	0.01	3.33±0.21hi
1	0.01	4.43±0.48gh
2	0.01	8.87±0.25f
3	0.01	5.57±0.95g
4	0.01	2.20±0.33i
1	0.05	0.00±0.00j
2	0.05	0.00±0.00j
3	0.05	0.00±0.00j
4	0.05	0.00±0.00j

注:同列数字后不同小写字母表明数据间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

标准的碱基平均识别率为 93.69%,均符合正常标准;样本的测序深度为 72.002 9,测序结果在参考基因组中的比对率和覆盖率分别为 98.30% 和 92.85%(表 6)。

表 5 2 种质量浓度甲氧咪草烟溶液对水稻幼苗的影响

处理	处理方式	处理幼苗 数量/株	幼苗存活 数量/株	幼苗平均 存活率/%
对照 1 (CK1)	愈伤组织分化培养阶段培养基中不添加 NaN_3 溶液和甲氧咪草烟溶液;分化苗种植 15 d(幼苗)喷施田间推荐剂量 1 倍质量浓度(3.16 g/L)甲氧咪草烟溶液	5	0	0
对照 2 (CK2)	愈伤组织分化培养阶段培养基中不添加 NaN_3 溶液和甲氧咪草烟溶液;分化苗种植 15 d,喷施田间推荐剂量 2 倍质量甲氧咪草烟溶液(6.32 g/L)	5	0	0
处理 1	愈伤组织分化培养阶段培养基中添加 NaN_3 溶液和甲氧咪草烟溶液;分化苗种植 15 d 喷施田间推荐剂量 1 倍质量浓度(3.16 g/L)甲氧咪草烟溶液	5	4	80
处理 2	愈伤组织分化培养阶段培养基中添加 NaN_3 溶液和甲氧咪草烟溶液;分化苗种植 15 d(幼苗)喷施田间推荐剂量 2 倍质量浓度(6.32 g/L)甲氧咪草烟溶液	5	2	40

重测序结果检测到 4 215 588 个 SNP,在检测的 SNP 位点中杂合体数量和纯合体数量分别为 1 292 657

和 2 912 516,其中杂合比率为 30.66%,同类核苷酸之间的变异与不同类核苷酸之间的变异的比率为

表 6 重测序数据统计

样本名称	片段数	碱基数	Q20/%	Q30/%	GC 含量/%	测序深度	比对率/%	覆盖率/%
抗性水稻苗	88 069 376	26 420 812 800	97.72	93.69	42.39	72.002 9	98.30	92.85

2.45%;在重测序的 707 942 个 InDel 位点中,杂合体数量和纯合体数量分别为 179 555 和 525 740,发生插入和缺失数分别为 26 025 623 和 46 581。以上结果表明,本次重测序深度已达到测序要求。

已知 ALS 基因的突变会降低植物对 ALS 抑制类除草剂的亲和力,进而产生抗性^[15]。在水稻 ALS 基因中没有内含子,只有一个外显子,OsALS 基因编码

区序列全长为 1 935 bp,编码 644 个氨基酸^[16]。根据与抗除草剂材料的序列对比发现,有 1 处碱基变化(图 1),第 199 位的 C/A 突变导致第 67 位氨基酸由脯氨酸变为苏氨酸,该突变不位于基因的 3 个结构域 TPP_PYR_POX_like, TPP_enzyme_M 和 TPP_AHAS 中(图 2)。进一步的 sanger 测序也验证了该位点。因此,本研究中的水稻突变材料为靶位点抗性。

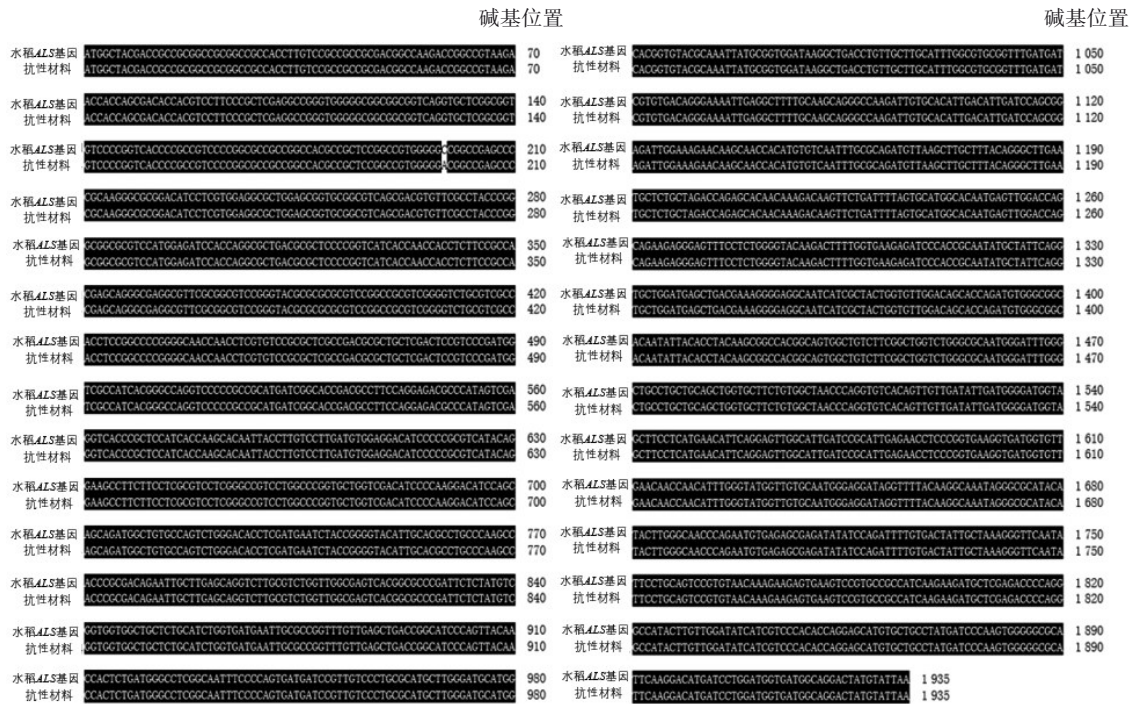


图 1 抗性水稻材料 ALS 基因序列与参考基因组序列对比

3 讨论与结论

近年来,化学诱变剂已成为作物改良的重要工具。与常规 EMS 诱变对比,EMS 诱变效率较低,工作量大。NaN₃ 诱变方法筛选方便、效率高、时间短,大大减少了试验的工作量^[17]。通过组培技术与化学诱变育种相结合,可有效提高突变频率,从而有效地筛选到抗性植株。陆荣生等^[18]通过对木薯进行 EMS 诱变和草甘膦共同处理筛选愈伤组织得到抗草甘膦分化苗,筛选出 8 个抗性无性系,对其中 5

个进行除草剂喷施,发现有 2 株具有抗性,与本试验筛选出 10 株中有 6 株具有抗性植株相对比其抗性材料分化率略低,可能与草甘膦的毒性有关。吴丹丹等^[19]先通过对水稻种子 EMS 诱变后再对水稻愈伤组织进行除草剂氟吡甲禾灵筛选。通过对 5 000 颗水稻愈伤组织进行筛选,其中 25 颗愈伤组织具有抗性但仅有 1 颗愈伤组织分化出 1 株抗性幼苗,其抗性分化率为 4%。这与本试验先进行愈伤组织培养再进行 NaN₃ 诱变与除草剂筛选的过程有差别,而本试验的抗性分化率约为 60%。因此,本试验不仅

		氨基酸位置
水稻ALS基因	MATTAATAAATLSAAATAKTCRKNHQHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPSPAPPATPLRPWGIAEAF	70
抗性材料	MATTAATAAATLSAAATAKTCRKNHQHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPSPAPPATPLRPWGIAEAF	70
水稻ALS基因	RKGADILVEALERCVSDFVAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCA	140
抗性材料	RKGADILVEALERCVSDFVAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQGEAFAASGYARASGRVGVCA	140
水稻ALS基因	TSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIC TDAFQETPIVEVTRSI TKHNVLVLDVEDIPRVIQ	210
抗性材料	TSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIC TDAFQETPIVEVTRSI TKHNVLVLDVEDIPRVIQ	210
	TPP_PYR_POX like	
水稻ALS基因	EAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLCESRRPILYV	280
抗性材料	EAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLCESRRPILYV	280
水稻ALS基因	GGGCSASGDELRRFVELTGIPVTTMLGNGFSDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFD	350
抗性材料	GGGCSASGDELRRFVELTGIPVTTMLGNGFSDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFD	350
	TPP_enzyme_M	
水稻ALS基因	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKKNQPHVSI CADVKLALQGLNALLDQSTTKTSSDFS AWHNELDQ	420
抗性材料	RVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKKNQPHVSI CADVKLALQGLNALLDQSTTKTSSDFS AWHNELDQ	420
水稻ALS基因	QKREFPLGKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIIATGCVGHQMWAAQYTYKRPQWLSSAGLGAMGFG	490
抗性材料	QKREFPLGKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIIATGCVGHQMWAAQYTYKRPQWLSSAGLGAMGFG	490
水稻ALS基因	LPAAGASVANPGVTVDIDGCSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHT	560
抗性材料	LPAAGASVANPGVTVDIDGCSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHT	560
	TPP_AHAS	
水稻ALS基因	YLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGA	630
抗性材料	YLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGA	630
水稻ALS基因	FKDMILDGDGRTMY	644
抗性材料	FKDMILDGDGRTMY	644

图2 抗性水稻材料氨基酸序列与 ALS 氨基酸序列对比

提高了抗性材料分化的效率,而且为水稻抗除草剂诱变育种的研究提供了新方案。

目前绝大部分抗 ALS 抑制类除草剂抗性机制主要是通过靶标基因突变的方式对除草剂产生抗药性^[20]。目前,在杂草抗性研究中发现有 8 个氨基酸位点,分别是 Ala122、Pro197、Ala205、Asp376、Arg377、Trp574、Ser653 和 Gly654,以上位点的突变可能会导致 ALS 酶对除草剂的敏感度下降^[21]。目前水稻中已经报道的抗 ALS 类除草剂的突变位点,主要为 Gly95、Ala96、Ala122、Pro197、Ala205、Asp376、Trp548、Trp574、Ser627、Gly628、Ser653、

Gly654 等位点的氨基酸突变^[22-25]。本试验通过鉴定发现在第 199 位的 C/A 突变,导致第 67 位氨基酸由脯氨酸变为苏氨酸,与前人研究的比较未发现该位点突变。因此,本研究为 ALS 基因的抗除草剂新位点提供参考。

本试验利用不同浓度 NaN₃ 诱变剂与质量浓度甲氧咪草烟除草剂对水稻愈伤进行组织培养和抗除草剂筛选这种方法,筛选出了抗甲氧咪草烟的水稻突变材料。该方法属于研究水稻抗除草剂材料培育与筛选的新方法,为进一步研究水稻诱变育种、创造抗除草剂水稻新种质提供了新思路。

参考文献:

[1] 魏继坤.抗除草剂水稻种质创制研究进展[J].河北农机,2024(6):138-140.

[2] 吴云雨,肖宁,余玲,等.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.

[3] 周延彪,秦鹏,赵新辉,等.抗除草剂水稻种质资源研究进展[J].杂交水稻,2019,34(1):1-5.

[4] 李红,李波.叠氮化钠诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2018(22):142-146+249.

[5] 徐明,路铁刚.植物诱变技术的研究进展[J].生物技术进展,2011,1(2):90-97.

[6] IQBAL M S, IQBAL Z, HASHEM A, et al. Nigella sativa callus treated with sodium azide exhibit augmented antioxidant activity and DNA damage inhibition[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):13954.

- [7] 蔺豆豆,赵桂琴,官文龙,等.叠氮化钠对燕麦种子萌发及幼苗生长的影响[J].草原与草坪,2023,43(5):84-90.
- [8] 吴正景,张菊平,时灿辉,等.叠氮化钠诱变玉扇愈伤组织的研究[J].植物生理学通讯,2010,46(12):1247-1250.
- [9] SPENCE R K. The influence of sodium azide on the biological effects of ionizing radiation in moist barley seeds [D]. Pullman: Washington State University, 1965.
- [10] 宋鹏,魏松红,王艳辉,等.不同诱变方法对抗咪唑乙烟酸水稻筛选的影响[J].沈阳农业大学学报,2009,40(5):541-545.
- [11] 项秉晗,蔡新仪,彭震,等.甲氧咪草烟对耐咪唑啉酮类除草剂水稻后茬作物的安全性[J].农药,2022,61(12):889-893+915.
- [12] 邹拓,杜琪,耿雷跃,等.抗除草剂水稻耐药性及后代筛选方法的研究[J].江苏农业科学,2022,50(13):136-140.
- [13] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 317-347.
- [14] 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.
- [15] 刘长乐,郭月,李芳芳,等.抗ALS类除草剂作物种质创制与利用研究进展[J].植物遗传资源学报,2022,23(2):333-345.
- [16] McCOURT J A, PANG S S, KING-SCOTT J, et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(3):569-573.
- [17] 钮力亚,于亮,付晶,等.叠氮化钠在农作物育种中的应用[J].河北农业科学,2010,14(12):52-53+57.
- [18] 陆荣生,韩美丽,杨迪,等.木薯EMS离体诱变及抗草甘膦植株的筛选[J].园艺与种苗,2017(5):63-66.
- [19] 吴丹丹,许敏敏,刘兆明,等.抗ACCase抑制剂类除草剂水稻种质的创制与鉴定[J].中国种业,2024(2):72-76.
- [20] GARCIA M D, NOUWENS A, LONHIENNE T G, et al. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(7):E1091-E1100.
- [21] 张玲玲,徐凡,李嘉文,等.杂草对除草剂抗性机理研究进展[J].农药学学报,2024,26(4):703-715.
- [22] 吴云雨,肖宁,余玲,等.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.
- [23] LI J, LI M, GAO X X, et al. 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):2538-254.
- [24] QIU J, JIA L, WU D Y, et al. Diverse genetic mechanisms underlie worldwide convergent rice feralization [J]. Genome Biology, 2020, 21(1):1-11.
- [25] RUZMI R, AHMAD-HAMDANI M S, MAZLAN N. Ser-653-Asn substitution in the acetohydroxyacid synthase gene confers resistance in weedy rice to imidazolinone herbicides in Malaysia [J]. Plos One, 2020, 15(9):e02273.