

烟草愈伤组织对苯磺隆的抗性诱导及抗性植株筛选

刘 伟, 王金信, 杨广玲, 隋标峰, 鲁 梅

(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘要:【目的】以烟草(NC-82)为试验对象,运用组织培养方法,通过对苯磺隆对烟草愈伤组织抗性发展的影响、对愈伤组织生长的影响、对愈伤组织分化率的影响、对愈伤组织乙酰乳酸合成酶活性的影响和抗性筛选再生烟草苗抗性潜势进行较系统的研究,以期对ALS抑制剂类除草剂的抗性研究和科学合理使用以延缓抗药性的发生,以及对作物的抗性育种提供一定的理论依据。【方法】将烟草诱导产生的胚性愈伤组织在含有不同剂量磺酰脲类除草剂苯磺隆的MS培养基上继代培养进行抗性诱导,并对愈伤组织的生长情况及其ALS对苯磺隆敏感性进行跟踪检测;对抗性筛选再生烟草苗进行抗性检测。【结果】随着培养代数的增加,愈伤组织对苯磺隆的抗药性逐渐增强,经过12代的培养,0、2、3、5 a.i.mg·L⁻¹ 4个剂量下的抗性指数分别达到1.4、3.6、11.6、18.5,LC₅₀分别为4.2、10.8、34.9、55.7 a.i.mg·L⁻¹,组织内乙酰乳酸合成酶(ALS)对苯磺隆的敏感性也逐渐降低。高剂量苯磺隆30 a.i.g·ha⁻¹茎叶处理抗性再生烟草苗,4个剂量下的成活率分别为5.8%、27.3%、43.8%和63.3%。在培养过程中烟草愈伤组织的分化率逐渐降低,并对苯磺隆产生轻微抗药性,但与苯磺隆的诱导无密切关系。【结论】烟草愈伤组织对磺酰脲类除草剂产生抗药性的速率很快,且选择压越高,抗药性发展越快。苯磺隆显著抑制烟草愈伤组织的生长,在形态上也发生变化,较对照色泽略深,质地紧密,组织内乙酰乳酸合成酶(ALS)对苯磺隆的敏感性也逐渐降低;烟草愈伤组织苯磺隆产生的诱导抗性可以在烟草整株水平上表达,诱导抗性随着诱导剂量的增加而增强。

关键词: 烟草; 苯磺隆; 抗性诱导; 组织培养

Inducement of Tribenuron-methyl Resistant Callus and Regeneration of Plantlet in Tobacco

LIU Wei, WANG Jin-xin, YANG Guang-ling, SUI Biao-feng, LU Mei

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: 【Objective】 Research was carried out to study the relationship of tribenuron-methyl with resistance development, embryonic callus growth, regeneration rate, ALS sensitivity, the resistance of regenerated plantlet, bring academic support to the study of resistance of ALS inhibitor herbicides and resistance breeding. 【Method】 Embryonic callus derived from tobacco (NC-82) were transferred to MS culture medium substrate with different doses of tribenuron-methyl and bred for 12 generations. 【Result】 The callus resistance to tribenuron-methyl was enhanced during subculture with resistance index of 1.4, 3.6, 11.6 and 18.5. LC₅₀ was 4.2, 10.8, 34.9, 55.7 a.i.mg·L⁻¹ respectively with selected doses 0, 2, 3, 5 a.i.mg·L⁻¹ at the 12th generation while ALS sensitivity to tribenuron-methyl was reduced. The speed of tobacco callus resistance development was faster with higher dose. The survival rates of regenerated plantlet treated with higher doses (30 a.i.g·ha⁻¹) of tribenuron-methyl were 5.8%, 27.3%, 43.8% and 63.3%, and the induced resistance was expressed in the plantlet. During subculture the regeneration rate of callus was reduced and engendered slight resistance, but not related with tribenuron-methyl inducement. 【Conclusion】 The resistance development of tobacco embryonic callus to tribenuron-methyl was very fast, with higher speed in the higher selective press. Tribenuron-methyl obviously restrained the callus growth, changed the callus appearance. At the same time ALS sensitivity to tribenuron-methyl was reduced, and the resistance was expressed in the regenerated plantlet.

Key words: Tobacco; Tribenuron-methyl; Resistance inducement; Tissue culture

收稿日期: 2005-12-18; 接受日期: 2007-04-30

基金项目: 山东农业大学博士基金

作者简介: 刘伟 (1978-), 男, 山东泰安人, 研究方向为除草剂抗药性。E-mail: andrelwei@163.com。通讯作者王金信 (1962-), 男, 山东胶南人, 教授, 博士, 研究方向为除草剂毒理及应用技术。Tel: 0538-8241114; E-mail: wangjx@sdaa.edu.cn

0 引言

【研究意义】磺酰脲类化合物作为一类作用独特的超高效除草剂,能被植物根、茎、叶吸收并在体内迅速传导,抑制植物生长而造成死亡,其作用靶标乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS)是支链氨基酸生物合成第一阶段的关键性酶,磺酰脲类除草剂抑制 ALS 活性,使缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸合成受抑,导致蛋白质合成停止,最终使植物死亡^[1,2],但是,正因为 ALS 抑制剂类除草剂的作用位点单一,抗药性的产生十分迅速^[3-5]。苯磺隆(tribenuron-methyl)是由 Du Pont 公司开发的一种磺酰脲类除草剂,能够防除绝大部分一年生和越年生麦田阔叶杂草^[6]。韩新才报道,初步统计,2003 年中国苯磺隆获农业部登记证的产品达 56 个品种,企业达 42 家^[7]。由于成本的降低,苯磺隆将成为中国麦田除草的当家品种^[8]。【前人研究进展】Larkin 和 Scowcroft 对有关植物组织培养再生植株变异的资料加以评述,把经过组织培养中出现的再生植株的变异称为体细胞无性系变异(somaclonal variation),产生的变异株叫做细胞突变体,并发现再生植株中变异株的产生是一种普遍现象^[9],较为普遍的体细胞无性系变异发生频率 1%~3%^[10,11]。王延峰等用玉米胚性愈伤组织筛选出抗绿磺隆(Chlorsulfuron)的突变体^[12]。【本研究的切入点】本研究通过以烟草愈伤组织为研究对象,在不同苯磺隆选择压力下,研究烟草组织抗性发展趋势及靶标酶 ALS 活性的变化^[13],并进行抗性植株的筛选。【拟解决的关键问题】以期对 ALS 抑制剂类除草剂的抗性研究和科学合理使用以延缓抗药性的发生,以及对作物的抗性育种提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

烟草(NC82),山东农业大学植物保护学院烟草研究室提供,未施用过除草剂。10%苯磺隆可湿性粉剂、98%苯磺隆原粉,山东华阳科技股份有限公司提供。

1.2 供试药剂

6-苄氨基嘌呤(6-BA,上海伯奥生物科技有限公司);2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D,上海试剂四厂);琼脂粉(上海稼丰,进口分装);丙酮酸钠(天津市博迪化工有限公司);甲萘酚(中国医药上海化学试剂站);肌酸(上海恒信化学试剂有限公司);黄素

腺嘌呤二核苷酸(FAD,Fluka 公司);氯化硫胺素焦磷酸(TPP,E.MERCK 公司);牛血清蛋白(BAS,进口分装,上海伯奥生物科技有限公司),考马斯蓝 G-250(进口分装,上海伯奥生物科技有限公司),磷酸二氢钾(中国江苏南京中山集团公司化工厂,分析纯),磷酸氢二钾(中国江苏南京中山集团公司化工厂,分析纯),硫酸铵(天津市四通化工厂,分析纯)石英砂(天津市大茂化学试剂厂,分析纯)等。

1.3 烟草愈伤组织抗性诱导与检测

1.3.1 烟草愈伤组织的培养 烟草种子升汞消毒后植于 MS 培养基,培养无菌苗。选取 3~5 叶期的烟草无菌苗叶片,植于 MS+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹,诱导形成愈伤组织。选择生长旺盛、组织松散、淡黄绿色的胚性愈伤组织转入上述培养基进行继代培养。

本试验培养条件为光照培养箱 25℃、光照 12 h/d,光照强度 12 000 lux。

1.3.2 培养基苯磺隆选择浓度的确定 将培养的愈伤组织切成大小一致的小块,分别转移到含有 0、0.5、1、2、3、5、7 mg·L⁻¹ 苯磺隆的培养基上,定期观察,30 d 后,统计愈伤组织的死亡率,3 次重复,以死亡率的机率值(Y)和苯磺隆浓度对数值(X)建立回归方程(Y=a+bx),求得 LC₂₀、LC₅₀、LC₉₀,以此确定选择培养基苯磺隆浓度。

1.3.3 抗除草剂愈伤组织的筛选及抗性检测 将 0.1 g/块愈伤组织转移到含有 0、2、3、5 mg·L⁻¹ 苯磺隆的诱导培养基(MS+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹)上培养,每 40 d 测定鲜重抑制率,选择生长旺盛、淡黄绿色的愈伤组织继代 1 次,记为 F_n(n=1、2、3、……)。每继代 2 次,将经筛选的 0.1 g/块愈伤组织植入含梯度剂量的苯磺隆 MS 培养基上,30 d 后测定鲜重,得 LC₅₀,计算 F_n 抗性倍数=F_n 的 LC₅₀/3.3 a.i.mg·L⁻¹(3.3 a.i.mg·L⁻¹ 为 1.3.2 测得的 LC₅₀ 值)。

1.3.4 乙酰乳酸合成酶提取与活性测定 在继代培养过程中,每 2 代进行检测苯磺隆对愈伤组织 ALS 离体抑制活性,参照 Fan 等方法^[14,15],并略有改动。将 1 g 烟草愈伤组织放入预冷玻璃研钵中,加入 4 ml 酶提取液(0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, pH=7,其中含有 1 mmol·L⁻¹ 丙酮酸钠,0.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.5 mmol·L⁻¹ TPP,10 μmol·L⁻¹ FAD)和适量石英砂,冰浴条件下快速研磨匀浆,置于离心管中定容至 8 ml,于 25 000 g,4℃下离心 20 min;取上清液缓慢加入(NH₄)₂SO₄ 晶体至 50%饱和度(参硫酸铵沉淀饱和度表),沉淀

2 h 后, 于 25 000 g, 4℃ 下离心 30 min, 弃上清液, 沉淀溶于 6 ml 酶溶解液中待测。在 10 ml 具塞试管中加入 0.9 ml 酶反应液、1 ml 酶液和 0.1 ml 磷酸缓冲液 (pH=7.0, 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液), 摇匀后在 35℃ 恒温水浴中暗反应 1 h, 加入 0.2 ml 的 3 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 中止反应, 于 60℃ 水浴脱羧 15 min。加入 1 ml 0.5% 肌酸和 1 ml 5% 甲萘酚 (2.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液配制), 60℃ 水浴显色 15 min, 迅速置于冰浴中冷却 1 min, 于 525 nm 比色。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法。

ALS 活性以 A₅₂₅/mg (protein) h 表示, ALS 相对活性 = F_n A₅₂₅/mg (protein) h / F₀ A₅₂₅/mg (protein) h。

1.3.5 植株分化率及再生烟苗抗性潜势检测 每继代 2 次, 将抗性诱导的愈伤组织植入到分化培养基 MS+2mg·L⁻¹ 6-BA+0.5mg·L⁻¹ 2,4-D 上进行分化培养, 烟草愈伤组织出现绿色芽点即为分化, 30 d 后检测分化率。F₁₂ 代将分化小苗转入生根培养基 MS+2.5

mg·L⁻¹ 2,4-D 上生根, 20 d 后, 将生根的再生苗移入装有育苗基质的营养钵中, 遮荫缓苗 7 d, 待长至 4 叶期, 用 10% 苯磺隆可湿性粉剂 30 a.i.g·ha⁻¹ 茎叶处理, 40 d 检查死亡率, 种植未经组织培养的烟草作为对照, 抗性指数 = F₁₂ 再生苗死亡率 / 对照死亡率。

2 结果与分析

2.1 培养基苯磺隆浓度对烟草愈伤组织成活率及选择浓度的确定

将培育的烟草愈伤组织转入至含有苯磺隆的培养基上, 高剂量条件下愈伤组织的生长速率明显减慢, 褐化率较高, 4~5 d 发现部分愈伤组织周围出现粘液, 最终变褐、变黑、变粘逐渐死亡, 存活的愈伤组织生长缓慢, 部分丧失胚性。低剂量下苯磺隆对烟草愈伤组织生长的抑制作用不明显, 结果见表 1。求得毒力回归方程, LC₂₀、LC₅₀、LC₉₀ 分别为 1.7、3.3、5.2 a.i.mg·L⁻¹。以此确定除草剂选择剂量分别为 2、3、5 a.i.mg·L⁻¹。

表 1 不同剂量苯磺隆对烟草愈伤组织生长的影响

Table 1 Effect of different dose of tribenuron-methyl on growth of tobacco callus

苯磺隆剂量 Dose (a.i.mg·L ⁻¹)	0	0.5	1	2	3	5	7
接种量 Inoculation quantity	50	50	50	50	50	50	50
存活量 Survive quantity	50	49.9	48.7	37.0	22.9	7.3	0.8
死亡率 Mortality (%)	0	0.10	3.20	26.0	51.2	85.4	98.5
毒力回归线 LC-P line	Y=3.0787+4.4906X R=0.9956						

2.2 苯磺隆对烟草愈伤组织生长的影响

苯磺隆能显著抑制烟草愈伤组织的生长, 经过苯磺隆处理的愈伤组织块明显减小, 且随着苯磺隆剂量的增加抑制作用愈加明显。在形态上, 经苯磺隆处理的愈伤组织较对照色泽略深, 质地紧密。随着烟草愈伤组织继代次数的增加, 苯磺隆对其生长的抑制作用减弱, 鲜重抑制率逐渐降低, 见图 1。在继代过程中烟草愈伤组织对苯磺隆驯化的适应能力随着苯磺隆使用剂量的增加而增强。在 2 a.i.mg·L⁻¹ 剂量下, 培养 11 代可使苯磺隆对烟草愈伤组织鲜重抑制率从 20.1% 发展到失去抑制作用; 3 a.i.mg·L⁻¹ 剂量下抑制率从 49.3% 到失去抑制作用需要继代 8 次; 而 5 a.i.mg·L⁻¹ 剂量下从 88.2% 到失去抑制作用只需继代 6 次, 抗性发展十分迅速。随着除草剂选择压力的增加, 烟草愈伤组织对苯磺隆抗性发展速度也显著加快。

2.3 苯磺隆对烟草愈伤组织抗性发展的影响

每继代 2 次, 检测烟草愈伤组织对苯磺隆的抗药

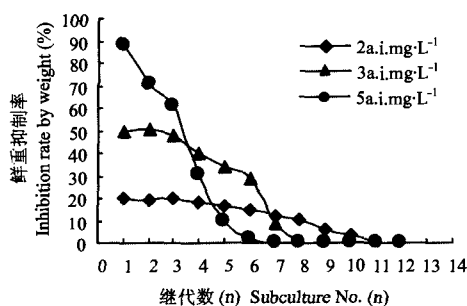


图 1 继代培养苯磺隆对烟草愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effect of tribenuron-methyl on growth of tobacco callus during subculture

性, 结果见图 2。苯磺隆的诱导剂量和筛选代数是影响烟草愈伤组织抗药性发展的主要影响因素。随着继代数的增加, 对照组愈伤组织对苯磺隆的抗药性也有所增加, 经过 12 代的培养, 0、2、3、5 a.i.mg·L⁻¹ 4

个剂量下的抗性指数分别达到 1.4、3.6、11.6、18.5, LC_{50} 分别为 4.2、10.8、34.9、55.7 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 。高剂量下, 烟草愈伤组织对苯磺隆的抗药性发展速度随着苯磺隆剂量的增加而明显加快, 抗性发展曲线呈“S”型曲线, 苯磺隆 5 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 剂量下经过 8 代就可达到抗性增长高峰, 8 代以后抗性发展也略有提高, 但趋于平缓; 而在 2 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 剂量下, 抗性发展一直比较缓慢, 基本没有较大的波动, 到 10 代后抗性趋于稳定。在 0 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 剂量下, 经 12 代的培养, 愈伤组织对苯磺隆产生较低的抗药性, 这可能与组织培养过程中组织细胞对有机营养物的依赖和驯化有关。

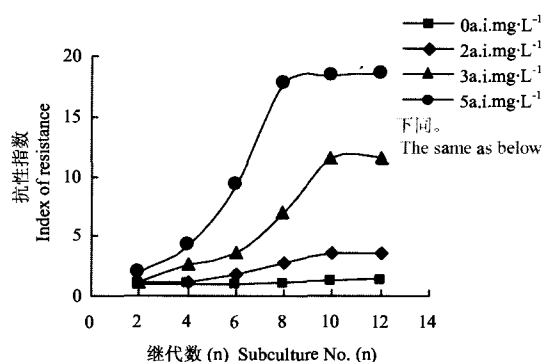


图 2 不同剂量苯磺隆对烟草愈伤组织抗性发展的影响
Fig. 2 Effect of tribenuron-methyl on resistance of callus of tobacco callus during subculture

2.4 苯磺隆对烟草愈伤组织分化率的影响

烟草愈伤组织继代培养过程中, 随着培养代数的增加, 愈伤组织的分化率明显逐渐降低, 结果见图 3。烟草愈伤组织在 0、2、3、5 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 4 个剂量下, F_0 的分化率分别为 99.3%、97.5%、98% 和 99%, F_4 后分化能力明显减弱, 下降速度很快; 到 F_{12} 烟草愈伤组织的分化率分别降为 20.1%、22%、19.6% 和 18.5%。而且, 同期未经苯磺隆处理 (0 $a.i.mg \cdot L^{-1}$) 的愈伤组织的分化率也呈同样的下降趋势。因此, 可以认为继代过程中愈伤组织分化能力的降低, 是烟草愈伤组织组织培养中的固有属性, 与苯磺隆的处理无相关性。

2.5 继代培养苯磺隆对烟草愈伤组织乙酰乳酸合成酶活性的影响

在不同剂量苯磺隆抗性筛选过程中, 烟草愈伤组织的 ALS 活性发生了显著变化, 见图 4。在继代培养过程中, 苯磺隆对烟草愈伤组织 ALS 活性逐渐失去抑制作用。继代培养的开始阶段, 烟草愈伤组织 ALS 酶

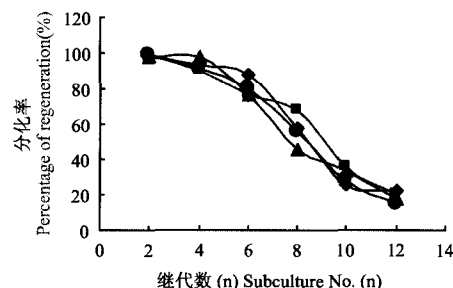


图 3 继代培养苯磺隆对烟草愈伤组织分化率的影响
Fig. 3 Effect of tribenuron-methyl on percentage of regeneration of tobacco callus during subculture

活性受到培养基中苯磺隆的较强抑制, 且随着苯磺隆剂量的提高, 抑制程度增强, 苯磺隆为 2、3、5 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 时, F_2 代 ALS 相对活性分别为 0.74、0.32 和 0.15。随着培养代数增加, 3、5 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 筛选条件下, ALS 相对活性不断提高, 但到 F_{10} 代相对活性达到约为 0.67 后, 活性略微下降, F_{12} 代分别降为 0.5 和 0.58。0 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 的继代培养过程中, ALS 相对活性在 F_4 代后下降明显, F_{12} 代为 0.54。2 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 筛选条件下, ALS 相对活性不断下降, 但是下降趋势相较于 0 $a.i.mg \cdot L^{-1}$ 略为缓和, 在此筛选条件下, 选择压力太低, 不足以抵消组织培养过程中培养基对 ALS 活性的影响所致。在苯磺隆的抗性筛选过程中, 不同剂量条件下的 ALS 相对活性趋于一致, 经 12 代的继代培养, 相对活性都到 0.6 上下, 出现这样的结果可能是在苯磺隆选择压力下使 ALS 相对活性的提高和组织培养过程中培养基对组织细胞的驯化使 ALS 活性下降两方面共同作用的结果。

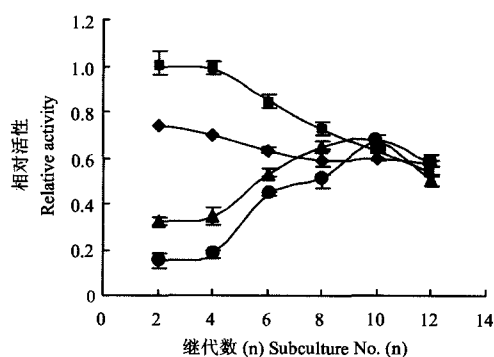


图 4 继代培养苯磺隆对烟草愈伤组织 ALS 活性的影响
Fig. 4 Effect of tribenuron-methyl on ALS activity of tobacco callus during subculture

2.6 苯磺隆抗性筛选再生烟苗抗性潜势

烟草在愈伤组织水平上所产生的对苯磺隆的抗药性能否在烟草再生植株上表达,对烟草愈伤组织是否真正产生诱导抗性是十分重要的。用 10% 苯磺隆可湿性粉剂高剂量 $30\text{a.i.g}\cdot\text{ha}^{-1}$ 处理烟草愈伤组织再生苗茎叶,结果见表 2。

表 2 苯磺隆 $30\text{a.i.g}\cdot\text{ha}^{-1}$ 茎叶处理对不同剂量诱导下的烟草再生植株存活率的影响

Table 2 Effect of tribenuron-methyl at $30\text{a.i.g}\cdot\text{ha}^{-1}$ on Regenerated tobacco survival rate

诱导剂量 ($\text{a.i.mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	处理株数 Treated plantlets	存活株数 Survival plantlets	存活率 (%) Plantlet survival rate
Inducement dose			
0	52	3	5.8
2	44	12	27.3
3	32	14	43.8
5	30	19	63.3
CK	50	0	0

结果表明,应用组织培养技术进行烟草苯磺隆抗性诱导,产生抗性愈伤组织,诱导抗性可以在烟草整株水平上表达。苯磺隆茎叶处理后,再生烟苗的存活率随着苯磺隆抗性诱导剂量的增加而增加, $5\text{a.i.mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的存活率可达 63.3%,表现较高的抗药性。 $0\text{a.i.mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量下经过 12 代的继代培养,烟草再生苗的存活率为 5.8%。可见,其对苯磺隆也产生了轻微的抗药性,可能是烟草愈伤组织细胞在组培条件下变异的结果。

3 讨论

通过植物组织培养技术进行抗除草剂细胞突变体的筛选研究,可以从大量细胞中诱导出所需的特性,是研究植物对除草剂抗性发展、抗性机理和抗性植株筛选研究的一种有效途径。在继代培养过程中,烟草愈伤组织的分化率下降速度较快,培养后期直接影响到抗性诱导愈伤组织的数量和抗性烟苗再生的成功,建议在继代培养后期,先将愈伤组织转移到不含有苯磺隆的分化培养基上进行再生,用再生烟苗叶片再进行抗性继代培养。在一定诱导剂量条件下,培养后期苯磺隆失去对愈伤组织的抑制作用,应逐渐增加苯磺隆剂量,以期获得更强的抗性植株。

随着抗性筛选代数的增加,在一定苯磺隆的诱导剂量下,作为苯磺隆唯一的作用靶标,ALS 的活性不断增

强,苯磺隆对烟草愈伤组织 ALS 活性逐渐失去抑制作用,是否是染色体形态、数量上的变异,或是 ALS 基因突变所导致,还须进一步研究。

试验中发现,随着苯磺隆选择剂量的增加,烟草愈伤组织的抗性产生速度也越快,再生苗的抗药性潜势也更强。这揭示了在苯磺隆等 ALS 抑制剂除草剂的使用过程中,一定要精确控制药剂的使用量,并注意药剂的混用、轮用,以降低相同作用机制除草剂的选择压,防止或减缓抗药性的产生。

4 结论

4.1 烟草愈伤组织对磺酰胺类除草剂产生抗药性的速率很快,且选择压越高,越容易产生抗药性。将烟草胚性愈伤组织在含 0、2、3、5 $\text{a.i.mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯磺隆的 MS 培养基上继代培养,愈伤组织对苯磺隆的抗药性逐渐增强,12 代时抗性指数分别达到 1.4、3.6、11.6、18.5, LC_{50} 分别为 4.2、10.8、34.9、55.7 $\text{a.i.mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4.2 苯磺隆能显著抑制烟草愈伤组织的生长。经苯磺隆处理的愈伤组织在形态上也发生变化,较对照色泽略深,质地紧密。但是对愈伤组织的分化率没有影响。

4.3 随着植物抗药性的增强,其组织内乙酰乳酸合成酶 (ALS) 对苯磺隆的敏感性也逐渐降低。

4.4 烟草愈伤组织苯磺隆产生的诱导抗性可以在烟草整株水平上表达,诱导剂量越高,产生抗性越高。以高剂量苯磺隆 $30\text{a.i.g}\cdot\text{ha}^{-1}$ 茎叶喷雾处理抗性再生烟苗,4 个诱导剂量下的成活率分别为 5.8%、27.3%、43.8% 和 63.3%。

References

- [1] Siew S P, Luke W G, Ronald G D. Molecular basis of sulfonyleurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 7639-7644.
- [2] Stephen O D. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 1990, 87: 263-271.
- [3] Stephen B P, Dale L S. Herbicide resistance and world grains. USA: CRC Press LLC, 2001.
- [4] Preston C, Powles S B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity*, 2002, 88: 8-13.
- [5] Siyuan T, Richard R E, Mark L D, Bijay K S, Dale L S. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science*, 2005, 61: 246-257.
- [6] 沙家骏. 化工产品手册—农用化学品. 北京: 化学工业出版社,

- 1999: 274.
- Sha J J. *Handbook of Chemical Products Agrochemical*. Beijing: Chemistry Industry Publishing House, 1999: 274. (in Chinese)
- [7] 韩新才, 李 晶. 麦田高效除草剂苯磺隆的特点及使用技术. 现代商贸工业, 2004, (4): 48-49.
- Han X C, Li J. The characteristic and application of high effective wheat herbicide tribenuron-methyl. *Modern Business Trade Industry*, 2004, (4): 48-49. (in Chinese)
- [8] 候常青. 苯磺隆价格大战的思考. 农药快讯, 2003, (7): 28.
- Hou C Q. The think of tribenuron-methyl price war. *Pesticide Express*, 2003, (7): 28. (in Chinese)
- [9] Larkin P J, Scowcroft W P. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 60: 197-214.
- [10] 林定波, 潘增光. 体细胞无性变异及其在果树新种质创造中的应用. 山东农业大学学报, 2000, 31(2): 221-226.
- Lin D B, Pan Z G. Somaclonal variation and its applications to germplasm creation in fruit trees. *Journal of Shandong Agricultural University*, 2000, 31(2): 221-226. (in Chinese)
- [11] Skirvin R M, Mcpheeters K D, Norton M. Sources and frequency of somaclonal variation. *Horticultural Sciences*, 1994, 29 (11): 1232-1237.
- [12] 王延峰, 李国胜. 玉米抗除草剂体细胞变异体的筛选及植株再生. 河南农业科学, 2001, 12: 16-19.
- Wang Y F, Li G S. Selection of herbicide- resistance somatic variants and regeneration of plant in maize. *Henan Agricultural Sciences*, 2001, 12: 16-19. (in Chinese)
- [13] Maria D O, Albert J F, Rafael D P. Herbicide resistance in *Aster squamatus* conferred by a less sensitive form of acetolactate synthase. *Pest Management Science*, 2003, 59: 1210-1216.
- [14] Fan Z J, Qian C F, Li Z M, Wang L X. Specific activity determination of acetolactate synthase from maize (*Zea mays* L.). *The Proceedings of the 18th Asia-Pacific Weed Science Society Conference*, 2001: 515-522.
- [15] Yu S K, Serebrennikov V W, Eneiskaya E V, Zagustina N A, Bezborodov A M. Isolation, purification and characterization of acetolactate synthase from a *Lactococcus lactis* culture. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, 37(2): 201-205.

(责任编辑 王红艳)