

# 抗精噁唑禾草灵和甲基二磺隆看麦娘 *ACC*ase和*ALS*基因突变

赵 宁 郭文磊 李 伟 吕玲玲 刘伟堂 王金信\*

(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

**摘要:** 为明确看麦娘 *Alopecurus aequalis* 抗性种群 YL 的靶标抗性机制, 采用基因克隆法对看麦娘抗性和敏感种群间乙酰辅酶 A 羧化酶 (*ACC*ase) 和乙酰乳酸合成酶 (*ALS*) 基因序列进行扩增、克隆和测序, 比对二者 *ACC*ase 和 *ALS* 基因序列的差异, 探寻其产生抗药性突变的基因位点, 同时测定该突变型抗性种群 YL 对不同 *ACC*ase 和 *ALS* 抑制剂类除草剂的交互抗性。结果显示, 与看麦娘敏感种群 TL 相比, 抗性种群 YL 的 *ACC*ase 基因 CT 区域第 2 041 位氨基酸由异亮氨酸 (ATT) 突变为天冬酰胺酸 (AAT), *ALS* 基因 Domain A 区域第 197 位氨基酸由脯氨酸 (CCC) 突变为精氨酸 (CGC)。看麦娘抗性种群 YL 对 *ACC*ase 抑制剂炔草酯产生了高水平抗性, 抗性倍数为 43.96, 对高效氟吡甲禾灵和精喹禾灵产生了中等水平抗性, 抗性倍数分别为 18.33 和 15.87, 对唑啉草酯、烯草酮和烯禾啶较敏感; 对 *ALS* 抑制剂氟唑磺隆产生了低水平抗性, 抗性倍数为 8.39, 对啶磺草胺和咪唑乙烟酸较敏感。表明 *ACC*ase 基因第 2 041 位和 *ALS* 基因第 197 位氨基酸突变是导致看麦娘抗性种群 YL 对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆同时产生抗性的重要原因之一。

**关键词:** 看麦娘; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 乙酰乳酸合成酶; 基因突变; 抗药性

## Mutations in the acetyl-CoA carboxylase and acetolactate synthase confer resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis* populations

Zhao Ning Guo Wenlei Li Wei Lü Lingling Liu Weitang Wang Jinxin\*

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

**Abstract:** The objective of this study is to understand the molecular basis of the target-resistance mechanism to fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis* and to find the specific mutation sites in amino acid sequences of acetyl-CoA carboxylase (*ACC*ase) and acetolactate synthase (*ALS*) in the YL population. Simultaneously, whole-plant dose-response experiments were conducted to evaluate the resistance levels to different *ACC*ase- and *ALS*-inhibiting herbicides in the resistant *A. aequalis* population. Fragments encoding the *ACC*ase and *ALS* were amplified and cloned from susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *A. aequalis*, respectively, and sequenced subsequently. The nucleotide sequence analysis showed that a substitution of isoleucine acid (Ile) 2 041 by asparagine acid (Asn) existed in the CT domain of *ACC*ase gene, and a substitution of proline acid (Pro) 197 by arginine acid (Arg) in the highly conserved region domain A of *ALS* gene in YL population. The *A. aequalis* YL population showed a high-level resistance to clodinafop-propargyl with a resistance index of 43.96, and a medium-level resistance to haloxyfop-*R*-methyl and quizalofop-*P*-ethyl, with resistance indexes of 18.33

基金项目: 国家自然科学基金(31471787), 国家公益性行业(农业)科研专项(201303031)

\* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: wangjx@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8241114

收稿日期: 2016-04-29

and 15.87, respectively, and was susceptible to pinoxaden. The YL population showed a low-level resistance to flucarbazone-Na, with a resistance index of 8.39, and was susceptible to pyroxsulam and imazethapyr. This study indicated that the substitutions of isoleucine acid at position 2 041 in the *ACCase* gene and proline acid at position 197 in the *ALS* gene might be the important reasons for target-resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl in *A. aequalis* populations.

**Key words:** *Alopecurus aequalis*; acetyl-CoA carboxylase; acetolactate synthase; gene mutation; resistance

看麦娘 *Alopecurus aequalis* 是冬小麦田及油菜田的一种恶性禾本科杂草,在我国主要分布在江苏、安徽和山东等省份,危害非常严重(唐洪元等,1990; Guo et al., 2015)。目前我国冬小麦田用于防除该类杂草的药剂主要是以精噁唑禾草灵为主的乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, *ACCase*)抑制剂和以甲基二磺隆为主的乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, *ALS*)抑制剂(Guo et al., 2015)。精噁唑禾草灵属于 *ACCase* 抑制剂中的芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂,通过抑制禾本科杂草质体型 *ACCase*, 阻断脂肪酸合成,破坏膜的完整性,进而造成代谢物的渗漏和植物的死亡(Cocker et al., 1999)。自1978年精噁唑禾草灵在中国正式登记以来,由于其作用位点单一以及长期大量重复使用,多个省份的冬小麦田中看麦娘对精噁唑禾草灵已经产生了不同程度的抗药性(Guo et al., 2015; Xia et al., 2015)。为了控制这些抗性杂草,进而改用甲基二磺隆防治。甲基二磺隆于2003年在中国正式登记,属于 *ALS* 抑制剂中的磺酰脲类除草剂,通过茎叶吸收后经木质部、韧皮部传导,抑制敏感植物体内 *ALS* 的活性,阻止支链氨基酸的生物合成,抑制细胞分裂,最终导致敏感植物死亡(刘伟等,2004; Bi et al., 2016)。然而,经过几年的使用,安徽、江苏等省份部分地区甲基二磺隆在大田推荐剂量下已不能对抗精噁唑禾草灵看麦娘进行有效防治(Guo et al., 2015)。

杂草抗药性主要包括2种机制:靶标抗性和非靶标抗性(Tan et al., 2007; Powles & Yu, 2010; Mohamed et al., 2012)。靶标抗性主要是通过基因作用位点的突变或特定酶的表达增强、过量表达及拷贝数增加导致除草剂靶标蛋白有所修饰进而产生抗性,非靶标抗性主要指杂草通过代谢解毒能力的增强或与作用位点的屏蔽作用或隔离作用对除草剂产生抗性(Délye, 2013)。在抗 *ACCase* 抑制剂类的杂草生物型中,多数高水平抗性的杂草生物型是由于其体内编码质体型 *ACCase* 保守区域基因作用位点突变,从而导致杂草对 *ACCase* 抑制剂的敏感性降

低(de Prado et al., 2000; Tranel & Wright, 2002; Bi et al., 2016)。截至2016年4月,全球共有47种杂草对 *ACCase* 抑制剂类除草剂产生了抗性,仅在我国就有8种 *ACCase* 抑制剂抗性杂草被报道(Heap, 2016)。目前,已证实有7个位点的氨基酸突变与杂草对 *ACCase* 抑制剂的抗性有关(Powles & Yu, 2010)。这些突变在大穗看麦娘 *A. myosuroides* 质体型 *ACCase* 全长序列中相应的位置及表达的氨基酸分别为第1 781位亮氨酸(Ile 1 781)、第1 999位色氨酸(Trp 1 999)、第2 027位色氨酸(Trp 2 027)、第2 041位亮氨酸(Ile 2 041)、第2 078位天冬氨酸(Asp 2 078)、第2 088位半胱氨酸(Cys 2 088)和第2 096位甘氨酸(Gly 2 096)。通常 *ACCase* 基因在这7个位点的不同突变形式会导致对不同 *ACCase* 抑制剂类除草剂产生不同的交互抗性(Délye et al., 2002; Powles & Yu, 2010)。

自Guttieri et al. (1995)首次报道了毒莠苣 *Lactuca serriola* 和地肤 *Kochia scoparia* 由于197位脯氨酸突变对 *ALS* 抑制剂产生抗药性以来,越来越多的植物或者杂草 *ALS* 基因也被进行了测序和分析。截至2016年4月,世界范围内共有158种杂草对 *ALS* 抑制剂类除草剂产生了抗性,我国共报道了14种抗 *ALS* 抑制剂的杂草,其中多种杂草对 *ALS* 抑制剂产生的抗性是由于其 *ALS* 基因一个或几个位点突变所导致(Tranel et al., 2017)。已证实有8个位点的氨基酸突变与杂草对 *ALS* 抑制剂类除草剂的抗性有关,这些突变位点在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *ALS* 氨基酸序列中相应的位置及表达的氨基酸分别为第122位丙氨酸(Ala 122)、第197位脯氨酸(Pro 197)、第205位丙氨酸(Ala 205)、第376位天冬氨酸(Asp 376)、第377位精氨酸(Arg 377)、第574位色氨酸(Trp 574)、第653位精氨酸(Ser 653)和第654位甘氨酸(Gly 654)。8个突变位点分别位于 *ALS* 基因的 Domain A~E 五个保守区中(Forlani et al., 1991; Boutsalis et al., 1999; Veldhuis et al., 2000)。

目前冬小麦田看麦娘发生严重,江苏省和安徽

省部分地区冬小麦田出现了抗精噁唑禾草灵和甲基二磺隆的看麦娘,且部分地区甲基二磺隆的大田推荐剂量已经无法对抗精噁唑禾草灵的看麦娘进行有效控制(Guo et al., 2015; Xia et al., 2015)。为进一步阐明看麦娘对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆产生抗性的分子机制,本试验对抗性和敏感看麦娘种群的 *ACCase* 和 *ALS* 基因进行扩增、克隆和比对,初步明确其产生抗药性突变的基因位点,同时测定该突变型抗性种群 YL 对不同 *ACCase* 和 *ALS* 抑制剂类除草剂的交互抗性,以期为抗性看麦娘治理及延缓其抗性发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试杂草种子:看麦娘抗性种群 YL 种子于 2012 年 5 月和 2013 年 5 月采自安徽省六安市炎刘镇冬小麦田,约有 10 年的精噁唑禾草灵和 6 年的甲基二磺隆用药历史;看麦娘敏感种群 TL 种子于 2013 年 5 月采自山东省日照市东港区涛雒镇非麦田,该非麦田从未使用过除草剂。在 2014 年 3 月种植并收集抗性和敏感种群植株的单株种子,供测试用。在 2015 年 2—6 月,使用整株水平测定法(Ryan, 1970)分别测定了看麦娘抗性种群 YL 对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆的抗性倍数,相对于敏感种群 TL,抗性种群 YL 对精噁唑禾草灵的抗性倍数达到 95.36,对甲基二磺隆的抗性倍数达到 31.27。

供试药剂:15% 炔草酯(clodinafop-propargyl)可湿性粉剂、5% 唑啉草酯(pinoxaden)乳油,瑞士先正达作物保护有限公司;108 g/L 高效氟吡甲禾灵(haloxyfop-R-methyl)乳油、7.5% 啶磺草胺(pyroxsulam)水分散粒剂,美国陶氏益农公司;10% 精喹禾灵(quizalofop-P-ethyl)乳油,山东康乔生物科技有限公司;240 g/L 烯草酮(clethodim)乳油,山东潍坊润丰化工股份有限公司;12.5% 烯禾啶(sethoxydim)乳油、75% 氟唑磺隆(flucarbazone-Na)水分散粒剂、10% 咪唑乙烟酸(imazethapyr)水剂,山东滨农科技有限公司。

试剂:RNAPlant Plus 植物总 RNA 提取试剂盒、Fast Quant RT Kit (with gDNase)、EasyTaq DNA Polymerase 试剂盒、TIANGel Midi Purification Kit、100 mg/mL 氨基青霉素钠盐,天根生化科技(北京)有限公司;Trans2K DNA Marker、pEasy-T1 Cloning Kit、Trans1-T1 Phage Resistant 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞,北京全氏金生物技术有限公司;溴

化乙锭(ethidium bromide, EB), 美国 Klontech 公司;5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D 半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, X-Gal)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、3-(*N*-吗啉基)丙磺酸(3-(*N*-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid, MOPS)、6 $\times$  DNA Loading Buffer、LB 培养基(干粉),北京索莱宝科技有限公司;其它试剂均为分析纯。

仪器:ASS-4 型自动控制农药喷洒系统,北京盛恒天宝科技有限公司;GXZ 型(多段编程)智能光照培养箱,宁波江南仪器厂;NanoDrop 2000 超微量分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;T100 型梯度 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;JY300C 型电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;ChampGel 6000 型紫外凝胶成像系统,北京赛智创业科技有限公司;3730 型全自动 DNA 测序仪,美国 ABI 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验材料的培养

选取均匀一致的单株看麦娘抗性种群和敏感种群种子,培养箱中 20 $^{\circ}$ C 催芽露白,播种于直径 15 cm、高 13 cm 的塑料钵内,每钵播种 12 粒,置于温室培养并进行必要的水肥管理。试验期间温室温度 15~25 $^{\circ}$ C、相对湿度 65%~75%、自然光照。待看麦娘生长至苗后 2 叶 1 心期间苗,每钵定苗 8 株。待幼苗生长至 3 叶 1 心期,分别剪取抗性种群和敏感种群单株的幼嫩叶片组织,迅速用液氮处理后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

#### 1.2.2 看麦娘总 RNA 提取及反转录

根据 NCBI 的 GenBank 登记的日本看麦娘 *A. japonicus* 质体型 *ACCase* 基因序列(JQ068820.1)和大穗看麦娘 *ALS* 基因序列(AJ437300)分别设计 *ACCase* 和 *ALS* 基因的扩增引物。其中, *ACCase* 基因引物序列为 ACC-F: 5'-GTATAATCTTGCTTCCGTGT-3' 和 ACC-R: 5'-AGCTGTTTCTTCCGAGCTTC-3', 扩增长度为 1 327 bp,退火温度为 56.0 $^{\circ}$ C; *ALS* 基因引物序列为: ALS-F: 5'-CGCCTTACCCAAACCTACTCTG-3' 和 ALS-R: 5'-AACCCTTTAGCAATCGTCACATA-3', 扩增长度为 1 859 bp,退火温度为 58.6 $^{\circ}$ C。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

使用 RNAPlant Plus 植物总 RNA 提取试剂盒提取看麦娘叶片的总 RNA。经 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定总 RNA 的质量和浓度;使用 Fast Quant RT Kit(with gDNase)进行总 RNA 的反转录,合成 cDNA 第一条链。反转录过程中, gDNA 去除

体系为 10  $\mu$ L: 5 $\times$ gDNA Buffer 2  $\mu$ L、Total RNA 模板 4  $\mu$ L、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L。混匀后简短离心,并于 42 $^{\circ}$ C 孵育 3 min,然后于冰上放置。20  $\mu$ L 反转录反应体系: gDNA 去除体系 10  $\mu$ L、RT Enzyme Mix 1  $\mu$ L、FQ-RT Primer Mix 2  $\mu$ L、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。反转录条件按照试剂盒说明,反转录得到的 cDNA 第一条链作为模板立即进行 PCR 扩增。

### 1.2.3 质体型 ACCase 基因片段的克隆

所有 PCR 使用 EasyTaq DNA Polymerase 试剂盒完成。25  $\mu$ L PCR 扩增体系: ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ L、10 $\times$  EasyTaq Buffer 2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L ACC-F 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L ACC-R 1  $\mu$ L、25 ng/L 反转录产物 1  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L EasyTaq DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 共 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。得到的 PCR 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。使用 TIANgel Midi Purification Kit 将扩增产物进行回收,经 pEasy-T1 Cloning Kit 将回收产物连接到 pEasy-T1 载体,连接体系包含 PCR 回收产物 4  $\mu$ L、pEasy-T1 Cloning Vector 1  $\mu$ L, 反应于 25 $^{\circ}$ C 保温 15 min。然后将连接产物转到大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 中,轻弹混匀后冰浴 25 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 s 并立即置于冰上 2 min; 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床孵育 1 h; 将孵育好的菌液涂布于含有 X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜; 挑取白色菌落到含终浓度 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h, 取菌液为模板进行 PCR 鉴定,阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序引物为克隆载体的通用引物 M13 Forward Primer 和 M13 Reverse Primer。

### 1.2.4 ALS 基因片段的克隆

ALS 基因 25  $\mu$ L PCR 扩增体系: ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ L、10 $\times$  EasyTaq Buffer 2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L ALS-F 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L ALS-R 1  $\mu$ L、25 ng/L 反转录产物 1  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L EasyTaq DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59.6 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 共 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物的电泳检测、回收、克隆和菌液 PCR 鉴定参考质体型 ACCase 基因片段克隆步骤。

### 1.2.5 除草剂靶标基因差异比较分析

ACCase 基因氨基酸序列编号以大穗看麦娘质体型 ACCase 全长序列(AJ310767.1)为标准,ALS 基

因氨基酸序列编号以模式植物拟南芥 ALS 全长序列为标准,使用 DNAMAN 6.0.3 软件分别对看麦娘抗性种群 YL 和敏感种群 TL 的 ACCase 和 ALS 基因序列进行比对,以获得导致抗性种群 YL 对除草剂产生抗性的靶标基因突变位点和突变形式。

### 1.2.6 看麦娘种群对不同除草剂的敏感性

采用整株水平测定法(Ryan, 1970),分别测定看麦娘抗性种群 YL 和敏感种群 TL 对不同除草剂敏感性及其抗性倍数。当看麦娘幼苗生长至 3 叶 1 心时,采用 ASS-4 型自动控制农药喷洒系统进行茎叶喷雾处理,调整喷头与幼苗叶片之间距离为 50 cm,喷液量为 450 L/hm<sup>2</sup>,喷雾压力为 0.275 MPa。通过预试验设定各除草剂处理浓度(表 1)。试验采用完全随机设计,每个处理设 3 次重复,抗性水平试验重复测定 2 次。喷药后 21 d 剪取看麦娘植株地上部分,称量鲜重并计算鲜重抑制率及抑制杂草 50% 生长量所需除草剂剂量(GR<sub>50</sub>)。鲜重抑制率=(空白对照杂草平均鲜重-处理组杂草平均鲜重)/空白对照杂草平均鲜重 $\times$ 100%。利用双逻辑非线性回归模型进行数据处理:  $y=C+\{(D-C)/[1+(x/GR_{50})^b]\}$ , 式中: C 为剂量反应下限; D 为剂量反应上限; x 为除草剂用量; b 为斜率。杂草对除草剂的抗性水平用抗性倍数表示,抗性倍数=抗性种群 GR<sub>50</sub>/敏感种群 GR<sub>50</sub>。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行 ANOVA 方差分析,当重复间无显著差异时对数据进行合并,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。采用 SigmaPlot 12.5 软件双逻辑非线性回归模型进行回归分析,得到双逻辑非线性回归模型及 GR<sub>50</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 看麦娘总 RNA 提取检测结果

看麦娘总 RNA 测定结果显示, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=2.20, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>=1.84, 浓度为 1.27  $\mu$ g/ $\mu$ L, 表明总 RNA 质量合格,浓度较高,可用于后续试验。

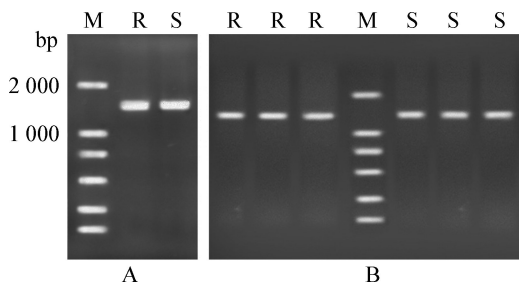
### 2.2 质体型 ACCase 基因片段的克隆

以看麦娘总 RNA 反转录产物为模板,按质体型 ACCase 基因片段的 PCR 条件扩增得到 1 300 bp 左右的片段,与预期 ACCase 目的片段 1 327 bp 长度一致(图 1-A)。扩增区域包含 ACCase CT 区域的 7 个已知突变位点。将目的片段按照上述克隆条件得到的单克隆菌落放置于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养,以菌液为模板进行 PCR 鉴定,抗性和敏感看麦娘均克隆出目的片段(图 1-B)。

表1 看麦娘抗性种群 YL 和敏感种群 TL 对不同除草剂敏感性测定中所使用除草剂浓度

Table 1 The herbicide rates used for detecting the cross-resistance to ACCase- and ALS-inhibiting herbicides in resistant and susceptible *Alopecurus aequalis* populations

| 药剂<br>Herbicide                        | 剂量 Dose (g (a.i.)/hm <sup>2</sup> ) |        |        |        |          |                                   |      |       |        |        |
|----------------------------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|----------|-----------------------------------|------|-------|--------|--------|
|                                        | 抗性种群 YL Resistant population YL     |        |        |        |          | 敏感种群 TL Susceptible population TL |      |       |        |        |
| 炔草酯 Clodinafop-propargyl               | 60.00                               | 120.00 | 240.00 | 480.00 | 960.00   | 1.88                              | 3.75 | 7.50  | 15.00  | 30.00  |
| 高效氟吡甲禾灵<br>Haloxypop- <i>R</i> -methyl | 3.04                                | 6.08   | 12.15  | 24.30  | 48.60    | 0.38                              | 0.76 | 1.52  | 3.04   | 6.10   |
| 精喹禾灵 Quizalofop- <i>P</i> -ethyl       | 4.50                                | 9.00   | 18.00  | 36.00  | 72.00    | 1.13                              | 2.25 | 4.50  | 9.00   | 18.00  |
| 唑啉草酯 Pinoxaden                         | 5.63                                | 11.25  | 22.50  | 45.00  | 90.00    | 1.41                              | 2.82 | 5.63  | 11.25  | 22.50  |
| 烯草酮 Clethodim                          | 3.04                                | 6.08   | 12.15  | 24.30  | 48.60    | 1.52                              | 3.04 | 6.08  | 12.15  | 24.30  |
| 烯禾啶 Sethoxydim                         | 6.25                                | 12.50  | 25.00  | 50.00  | 100.00   | 3.13                              | 6.25 | 12.50 | 25.00  | 50.00  |
| 氟唑磺隆 Flucarbazone-Na                   | 0.10                                | 1.00   | 10.00  | 100.00 | 1 000.00 | 0.01                              | 0.10 | 1.00  | 10.00  | 100.00 |
| 啶磺草胺 Pyroxusulam                       | 0.48                                | 2.40   | 12.00  | 60.00  | 300.00   | 0.10                              | 0.48 | 2.40  | 12.00  | 60.00  |
| 咪唑乙烟酸 Imazethapyr                      | 4.00                                | 20.00  | 100.00 | 500.00 | 2 500.00 | 0.80                              | 4.00 | 20.00 | 100.00 | 500.00 |

图1 抗性和敏感种群看麦娘质体型 *ACCase* 基因的克隆Fig. 1 Cloning of the plastidic *ACCase* gene fragments from resistant and susceptible *Alopecurus aequalis* populations

A: 质体型 *ACCase* 基因 PCR 扩增; B: 质体型 *ACCase* 基因菌液 PCR 鉴定; M: *Trans2K* DNA marker; R: 抗性种群 YL; S: 敏感种群 TL。A: Amplification of the plastidic *ACCase* gene fragments; B: identification of the plastidic *ACCase* gene fragments by PCR; M: *Trans2K* DNA marker; R: resistant population YL; S: susceptible population TL.

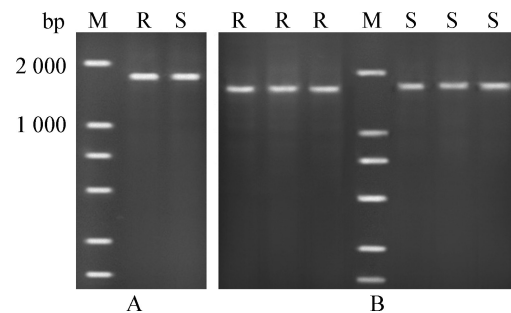
### 2.3 *ALS* 基因片段的克隆

以反转录产物为模板,按 *ALS* 基因片段 PCR 条件克隆得到 1 800 bp 左右的片段,与预期 *ALS* 目的片段 1 859 bp 长度一致(图 2-A)。扩增区域包含了 *ALS* 基因 5 个保守区的 8 个已知突变位点。将目的片段按照上述条件克隆并进行菌液 PCR 鉴定,抗性和敏感看麦娘均克隆出目的片段(图 2-B)。

### 2.4 抗性、敏感种群 *ACCase* 和 *ALS* 基因差异

将看麦娘抗性种群 YL 及敏感种群 TL 的质体型 *ACCase* 和 *ALS* 序列分别与大穗看麦娘质体型 *ACCase* 和拟南芥 *ALS* 核苷酸序列进行比对,结果表明,与敏感种群 TL 相比,抗性种群 YL 的 *ACCase* 基因 CT 区域第 6 122 位碱基发生了突变,导致第 2 041

位氨基酸由异亮氨酸 Ile(ATT)突变为天冬酰胺酸 Asn(AAT)(表 2);*ALS* 基因 Domain A 区域第 589 位碱基发生了突变,导致第 197 位氨基酸由脯氨酸 Pro(CCC)突变为精氨酸 Arg(CGC)(表 3)。

图2 抗性和敏感种群看麦娘 *ALS* 基因的克隆Fig. 2 Cloning of *ALS* gene fragments from resistant and susceptible *Alopecurus aequalis* populations

A: *ALS* 基因 PCR 扩增; B: *ALS* 基因菌液 PCR 鉴定; M: *Trans2K* DNA marker; R: 抗性种群 YL; S: 敏感种群 TL。A: Amplification of *ALS* gene fragments; B: identification of *ALS* gene fragments by PCR; M: *Trans2K* DNA marker; R: resistant population YL; S: susceptible population TL.

### 2.5 看麦娘抗性种群对不同除草剂的交互抗性

看麦娘抗性种群 YL 对 *ACCase* 抑制剂炔草酯产生了高水平抗性,抗性倍数为 43.96;对高效氟吡甲禾灵和精喹禾灵产生了中等水平抗性,抗性倍数分别为 18.33 和 15.87;而对唑啉草酯、烯草酮和烯禾啶抗性倍数最低,表明对其较敏感。同时,抗性种群 YL 对 *ALS* 抑制剂氟唑磺隆也产生了低水平抗性,抗性倍数为 8.39;对啶磺草胺和咪唑乙烟酸较敏感(表 4)。

表 2 看麦娘抗性种群质体型 ACCase 第 2 041 位氨基酸突变序列分析

Table 2 Sequence alignment and derived amino acids around position 2 041 of the plastidic ACCase gene from resistant *Alopecurus aequalis* population

| 种群<br>Population      | 各氨基酸的位置和碱基及相应氨基酸序列<br>The amino acid position, relative sequences of nucleotide and derived amino acids |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                       | 2 037                                                                                                   | 2 038 | 2 039 | 2 040 | 2 041 | 2 042 | 2 043 | 2 044 | 2 045 | 2 046 |
| 大穗看麦娘                 | CTT                                                                                                     | TTT   | GAA   | GGA   | ATT   | CTG   | CAG   | GCT   | GGG   | TCA   |
| <i>A. myosuroides</i> | Leu                                                                                                     | Phe   | Glu   | Gly   | Ile   | Leu   | Glu   | Ala   | Gly   | Ser   |
| TL(S)                 | CTT                                                                                                     | TTT   | GAA   | GGA   | ATT   | CTG   | CAG   | GCT   | GGG   | TCA   |
|                       | Leu                                                                                                     | Phe   | Glu   | Gly   | Ile   | Leu   | Glu   | Ala   | Gly   | Ser   |
| YL(R)                 | CTT                                                                                                     | TTT   | GAA   | GGA   | AAT   | CTG   | CAG   | GCT   | GGG   | TCA   |
|                       | Leu                                                                                                     | Phe   | Glu   | Gly   | Asn   | Leu   | Glu   | Ala   | Gly   | Ser   |

氨基酸序列编号以大穗看麦娘 *Alopecurus myosuroides* 质体型 ACCase 全长序列(AJ310767.1)为标准。Amino acid positions correspond to the full-length plastidic ACCase (AJ310767.1) in *A. myosuroides*.

表 3 看麦娘抗性种群 ALS 第 197 位氨基酸突变序列分析

Table 3 Sequence alignment and derived amino acids around position 197 of the ALS gene from resistant *Alopecurus aequalis* population

| 种群<br>Population   | 各氨基酸的位置和碱基及相应的氨基酸序列<br>The amino acid position, relative sequences of nucleotide and derived amino acids |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 191                                                                                                      | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| 拟南芥                | GCC                                                                                                      | ATC | ACG | GGG | CAG | GTT | CCT | CGC | ATG | ATA |
| <i>A. thaliana</i> | Ala                                                                                                      | Ile | Thr | Gly | Gln | Val | Pro | Arg | Arg | Met |
| TL(S)              | GCC                                                                                                      | ATG | ACG | GGG | CAG | GTT | CCC | CGC | CGC | ATG |
|                    | Ala                                                                                                      | Ile | Thr | Gly | Gln | Val | Pro | Arg | Arg | Met |
| YL(R)              | GCA                                                                                                      | ATG | ACG | GGC | CAA | GTT | CGC | CGC | CGC | ATG |
|                    | Ala                                                                                                      | Ile | Thr | Gly | Gln | Val | Arg | Arg | Arg | Met |

氨基酸序列编号以模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 ALS 全长序列为标准。Amino acid positions correspond to the full-length ALS in *A. thaliana*.

表 4 看麦娘抗性种群和敏感种群对不同除草剂的交互抗性

Table 4 The patterns of cross-resistance in resistant and susceptible *Alopecurus aequalis* populations

| 药剂<br>Herbicide            | GR <sub>50</sub> (g (a.i.)/hm <sup>2</sup> ) |                                      | 抗性倍数<br>Resistance ratio |
|----------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                            | 抗性种群 YL<br>Resistant population YL           | 敏感种群 TL<br>Susceptible population TL |                          |
| 炔草酯 Clodinafop-propargyl   | 185.07±5.66 a                                | 4.21±0.42 de                         | 43.96                    |
| 高效氟吡甲禾灵 Haloxifop-R-methyl | 22.55±2.33 d                                 | 1.23±0.15 fg                         | 18.33                    |
| 精喹禾灵 Quizalofop-P-ethyl    | 44.91±3.46 c                                 | 2.83±0.64 ef                         | 15.87                    |
| 唑啞草酯 Pinoxaden             | 7.92±1.33 e                                  | 4.19±1.07 de                         | 1.89                     |
| 烯草酮 Clethodim              | 11.83±1.12 e                                 | 8.16±0.83 ab                         | 1.45                     |
| 烯禾啞 Sethoxydim             | 12.83±0.86 e                                 | 9.65±2.27 a                          | 1.33                     |
| 氟唑磺隆 Flucarbazone-Na       | 53.19±3.47 b                                 | 6.34±1.53 cd                         | 8.39                     |
| 啞磺草胺 Pyroxsulam            | 1.46±0.22 f                                  | 0.74±0.12 g                          | 1.97                     |
| 咪唑乙烟酸 Imazethapyr          | 11.75±1.26 e                                 | 6.89±0.95 bc                         | 1.71                     |

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

### 3 讨论

基因突变是导致杂草抗药性产生的重要原因。目前关于除草剂靶标酶基因氨基酸突变产生的杂草抗性方面的报道较多(Christopher et al., 1992; Tranel & Wright, 2002)。在安徽省部分地区冬小麦田采集的抗性看麦娘中同时检测到了 *ACC*ase 基因 Ile-1 781-Leu 和 *ALS* 基因 Trp-574-Leu 两种突变, 导致看麦娘对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆均产生了抗药性(Guo et al., 2015)。本研究使用的抗性看麦娘种群 YL 采集自安徽省六安市寿县, 有着多年精噁唑禾草灵和甲基二磺隆用药历史。本试验从分子水平出发, 在抗性看麦娘种群 YL 靶标酶基因中同时检测到 *ACC*ase 的 Ile-2 041-Asn 和 *ALS* 的 Pro-197-Arg 两种突变类型, 这可能是看麦娘抗性种群 YL 对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆均产生抗药性的重要原因。

由于不同除草剂和靶标酶在空间构象上结合位点的不同, 以及不同地区除草剂应用历史和水平的差异, 导致了同一种突变形式对同一作用机制不同类别的除草剂抗性情况也有所不同(崔海兰等, 2007; Powles & Yu, 2010; 毕亚玲等, 2015)。在本研究中, 抗性看麦娘种群 YL 对其它 *ACC*ase 和 *ALS* 抑制剂类除草剂也产生了不同水平的交互抗性。其中对炔草酯产生了高水平抗性, 对高效氟吡甲禾灵和精喹禾灵产生了中等水平抗性, 对氟唑磺隆产生了低水平抗性。这与之之前报道的 *ACC*ase 基因第 2 041 位突变会对芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂产生较高抗性及 *ALS* 基因第 197 位突变会对磺酰脲类除草剂产生较高抗性的结论一致(崔海兰等, 2007; Beckie & Tardif, 2012)。

非靶标抗性也是导致杂草对除草剂产生抗性的重要原因(Duhoux et al., 2015; 邱芳心等, 2015)。根据 Neve et al. (2009) 的研究, 长期施用单一除草剂有利于杂草体内非靶标抗性基因的积累。本研究采用的抗性看麦娘种子采集地小麦田具有长期施用单一除草剂的历史, 而且对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆均具有很高的抗性水平, 因此种群抗性中有非靶标抗性参与的可能性非常高。本试验只检测了抗性看麦娘靶标酶基因氨基酸的突变, 而其抗性是否有非靶标抗性参与还需要借助其它技术来进行检测, 比如转录组测序技术等(Yang et al., 2013; An et al., 2014; Gaines et al., 2014)。

看麦娘对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆产生抗性, 除与其本身的生物学特性有关之外, 还与麦田不

合理施用除草剂有很大的关系(Bi et al., 2016)。抗性看麦娘的发生和发展对田间除草剂的使用提出了更高的要求。看麦娘种群靶标抗性分子机制及其对不同种类除草剂交互抗性的研究, 对于生产实践中选择应用不同替代药剂, 避免和延缓杂草抗药性的发生具有指导意义。实际农业生产中, 合理选择并轮用、混用不同作用机制的除草剂, 把农业措施(如小麦与油菜轮作)与药剂防治措施相结合, 是控制小麦田看麦娘危害、延缓其抗药性发生的有效手段。

### 参 考 文 献 (References)

- An J, Shen X, Ma Q, Yang C, Liu S, Chen Y. 2014. Transcriptome profiling to discover putative genes associated with paraquat resistance in goosegrass (*Eleusine indica* L.). *PLoS ONE*, 9(6): e99940
- Beckie HJ, Tardif FJ. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35: 15–28
- Bi YL, Liu WT, Guo WL, Li LX, Yuan GH, Du L, Wang JX. 2016. Molecular basis of multiple resistance to *ACC*ase- and *ALS*-inhibiting herbicides in *Alopecurus japonicus* from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126: 22–27
- Bi YL, Wu CX, Guo WL, Li Q, Li RR, Wang JX. 2015. Mutation in the acetyl-CoA carboxylase confers resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl in *Alopecurus japonicus* populations. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 447–452 (in Chinese) [毕亚玲, 吴翠霞, 郭文磊, 李琦, 李蓉荣, 王金信. 2015. 抗精噁唑禾草灵的日本看麦娘 *ACC*ase 基因突变. *植物保护学报*, 42(3): 447–452]
- Boutsalis P, Karotam J, Powles SB. 1999. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science*, 55(5): 507–516
- Christopher JT, Powles SB, Holtum JAM. 1992. Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. *Plant Physiology*, 100(4): 1909–1913
- Cocker KM, Moss SR, Coleman JOD. 1999. Multiple mechanisms of resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl in United Kingdom and other European populations of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65(3): 169–180
- Cui HL, Tao LM, Liu X, Zhang CX, Zhang HJ. 2007. The review on the weed resistance to *ALS* inhibitors. *Pesticide Science and Administration*, 28(10): 47–52 (in Chinese) [崔海兰, 陶岭梅, 刘学, 张朝贤, 张宏军. 2007. *ALS* 抑制剂的杂草抗性概述. *农药科学与管理*, 28(10): 47–52]
- de Prado R, Gonzalez-Gutierrez J, Menendez J, Gazquez J, Gronwald J W, Gimenez-Espinosa R. 2000. Resistance to acetyl CoA carboxylase-inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. *Weed Science*, 48(3): 311–318
- Délye C. 2013. 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*, 69(2):

- 176–187
- Délye C, Matějček A, Gasquez J. 2002. PCR-based detection of resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Management Science*, 58(5): 474–478
- Duhoux A, Carrère S, Gouzy J, Bonin L, Délye C. 2015. RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. *Plant Molecular Biology*, 87(4/5): 473–487
- Forlani G, Nielseren E, Landi P, Tuberosa R. 1991. Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays* L.) inbred lines. *Weed Science*, 39(4): 553–557
- Gaines TA, Lorentz L, Figge A, Herrmann J, Maiwald F, Ott MC, Han HP, Busi R, Yu Q, Powles SB, et al. 2014. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *The Plant Journal*, 78(5): 865–876
- Guo WL, Yuan GH, Liu WT, Bi YL, Du L, Zhang C, Li Q, Wang JX. 2015. Multiple resistance to ACCase and AHAS-inhibiting herbicides in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124: 66–72
- Guttieri MJ, Eberlein CV, Thill DC. 1995. Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in kochia (*Kochia scoparia*) biotypes. *Weed Science*, 43(2): 175–178
- Heap IM. 2016. The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org>
- Liu W, Wang JX, Yang GL, Lu M. 2004. Resistance of weeds to acetolactate synthase inhibitors. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 6(4): 7–12 (in Chinese) [刘伟, 王金信, 杨广玲, 鲁梅. 2004. 杂草对乙酰乳酸合成酶抑制剂抗药性研究进展. *农药学报*, 6(4): 7–12]
- Mohamed IA, Li RZ, You ZG, Li ZH. 2012. Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) resistance to fenoxaprop and pinoxaden in China. *Weed Science*, 60(2): 167–171
- Neve P, Vila-Aiub M, Roux F. 2009. Evolutionary thinking in agricultural weed management. *New Phytologist*, 184(4): 783–793
- Powles SB, Yu Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 317–347
- Qiu FX, Du GP, Liu KL, Mao AX, Luo K. 2015. Research progress on weed to herbicides and control method. *Weed Science*, 33(2): 1–6 (in Chinese) [邱芳心, 杜桂萍, 刘开林, 毛爱星, 罗坤. 2015. 杂草抗药性及其治理策略研究进展. *杂草科学*, 33(2): 1–6]
- Ryan GF. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, 18(5): 614–616
- Tan MK, Preston C, Wang GX. 2007. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Weed Research*, 47(6): 534–541
- Tang HY, Wang XE, Shen GH. 1990. Study on the yield loss of wheat and barley caused by the infestation of *Alopecurus japonicus* and *A. aequalis*. *Journal of Weed Science*, 4(1): 8–12 (in Chinese) [唐洪元, 王学鹗, 沈国辉. 1990. 看麦娘等杂草对麦子产量损失的研究. *杂草学报*, 4(1): 8–12]
- Tranel PJ, Wright TR. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, 50(6): 700–712
- Tranel PJ, Wright TR, Heap IM. 2017. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.org>
- Veldhuis LJ, Hall LM, O'Donovan JT, Dyer W, Hall JC. 2000. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *Agricultural and Food Chemistry*, 48(7): 2986–2990
- Xia WW, Pan L, Li J, Wang Q, Feng YJ, Dong LY. 2015. Molecular basis of ALS- and/or ACCase-inhibitor resistance in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122: 76–80
- Yang X, Yu XY, Li YF. 2013. *De novo* assembly and characterization of the barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) transcriptome using next-generation pyrosequencing. *PLoS ONE*, 8(7): e69168

(责任编辑:李美娟)