

黑龙江省部分地区水稻田萤蔺对丙嗪嘧磺隆的抗性水平及其分子抗性机制

Resistance of paddy weed *Schoenoplectus juncooides* to propyrisulfuron in rice fields of part area of Heilongjiang Province and its molecular resistance mechanism

李 庚 吕晓曦 王春雨 吴 桐 赵长山*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

Li Geng Lü Xiaoxi Wang Chunyu Wu Tong Zhao Changshan*

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China)

萤蔺 *Schoenoplectus juncooides* 是我国水稻田的主要恶性杂草, 在黑龙江省发生普遍。除草剂丙嗪嘧磺隆杀草谱广, 可用于水稻田内杂草防除。近些年, 丙嗪嘧磺隆对黑龙江省部分萤蔺种群除草活性差, 疑似萤蔺对其抗性水平逐渐升高, 而 *ALS* 基因保守区的氨基酸突变是产生高水平抗性的重要原因。本研究拟利用生物测定法及分子生物学方法分析黑龙江省部分地区萤蔺种群对丙嗪嘧磺隆的抗性水平及抗性机制, 以期为该药的合理使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 萤蔺抗性种群为 JSJ、TY、856、854、HL、TL、SZ、MDJ, 于 2016 年分别采自黑龙江省佳木斯市抚远市建三江农场、汤原县, 虎林市八五六农场、八五四农场, 绥化市海伦市, 伊春市铁力市, 哈尔滨市尚志市, 牡丹江市周边的稻作区, 使用磺酰脲类除草剂均在 10 年以上, 部分地区施用过丙嗪嘧磺隆但防治效果不理想; 敏感性种群 S 于 2016 年采自黑龙江省七台河市勃利县长兴乡荒地, 未施用过除草剂。采用五点取样法, 每个种群采集 20 株。

药剂、试剂及仪器: 9.5% 丙嗪嘧磺隆 (propyrisulfuron) 悬浮剂, 日本住友化学株式会社。DL2000 Marker, 北京全氏金生物技术有限公司; 2×*Taq* PCR MasterMix、DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 溴化乙锭, 西格玛奥德里奇公司。T100 温度梯度 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; Bio Doc-It Imaging System 凝胶成像分析系统, 美国 UVP 公司; JY600C 电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

不同萤蔺种群的抗性水平测定: 将萤蔺种子于

4℃ 冰箱内低温层积 40 d 解除休眠后播种, 待萤蔺株高超过 10 cm 后, 采集各种群长势一致的萤蔺植株, 用无菌水洗净, 将距茎基部 2 cm 以下根切断的萤蔺浸入不同浓度丙嗪嘧磺隆水培液中。敏感种群药剂浓度分别为 0.016、0.032、0.064、0.128、0.256 mg/L, 抗性种群药剂浓度为 0.128、0.256、0.512、1.024、2.048 mg/L, 每个种群每个浓度重复 4 次。将浸药的萤蔺在光照强度 2 500 lx、温度 25℃ 的培养箱内培养 7 d 后测量其再生根长, 计算根长抑制率, 根长抑制率 = (对照根长 - 处理根长) / 对照根长 × 100%。采用 DPS 7.05 软件计算毒力回归方程, 达到 50% 抑制效果时的除草剂浓度 GI_{50} 、 GI_{90} 的 95% 置信限及相关系数 r , 并计算抗药性指数, 抗药性指数 = 抗性种群 GI_{50} / 敏感种群 GI_{50} , 抗药性指数 > 10 为高抗水平, 抗药性指数 < 10 为中抗水平。

不同萤蔺种群的 *ALS* 基因突变分析: 在萤蔺抽穗前对各种群的鲜活植株进行采集, 于 -80℃ 冷冻保存, 备用。每个种群取 3 株萤蔺进行单株基因组 DNA 提取。根据日本 DNA 数据库 (DNA data bank of Japan, DDBJ) 中萤蔺 *ALS1* 和 *ALS2* 的基因序列 (cDNA 的登录号: AB257441 和 AB257443), 利用 Oligo 7 软件设计 2 对引物 (F1: 5' -CCCCACGCCT-TACAA-3' 和 R1: 5' -TGCGAATTTGTCGTTTGACC-3'; F2: 5' -CACCCGCACACCTTAT-3' 和 R2: 5' -GGAAGGGATCACTTGAC-3')。PCR 反应体系: 萤蔺 DNA 模板 2 μL、2×*Taq* PCR MasterMix 25 μL、10 μmol/L 引物各 1 μL、ddH₂O 21 μL。*ALS* 基因 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 54.7℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3.4 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR

扩增结果。将符合预期大小、条带清晰的样品委托北京华大基因科技有限公司进行测序。参考邓维(2017)和袁雪等(2017),利用Chromas软件对萤蔺抗性种群与拟南芥敏感种群的ALS基因片段序列进行分析比对,寻找保守区域内基因突变位点。

2 结果与分析

2.1 不同萤蔺种群对丙嗪嘧磺隆的抗性水平

萤蔺敏感种群S的GI₅₀为0.03 mg/L,8个抗性种群

的GI₅₀介于0.27~0.98之间,抗药性指数介于8.59~31.61之间,表明大部分抗性种群属于高抗水平(表1)。

2.2 黑龙江省不同萤蔺种群ALS基因突变分析

在8个抗性种群中共发现了4种氨基酸取代方式,分别为ALS1上的Pro-197-Ser和Trp-574-Leu,ALS2上的Pro-197-Leu、Pro-197-Thr。856种群2个ALS基因同时发生突变,HL种群ALS1基因上2个位点发生突变,其余种群为单个位点发生突变(表2)。

表1 黑龙江省不同萤蔺种群对丙嗪嘧磺隆的抗性水平

Table 1 Resistance level of different *Schoenoplectus juncooides* populations to propyrisulfuron in Heilongjiang Province

种群 Population	回归方程 Linear regression equation	相关系数r Correlation coefficient	GI ₅₀ (mg/L)	95%置信限 95% confidence limit	抗药性指数 Resistance index
S	y=7.9356+1.9433x	0.9939	0.03	0.027-0.036	1.00
MDJ	y=5.7195+1.4390x	0.9943	0.32	0.280-0.370	10.29
JSJ	y=5.7659+1.3299x	0.9772	0.27	0.200-0.350	8.59
TY	y=5.5513+1.3371x	0.9905	0.39	0.330-0.450	12.52
HL	y=5.1086+1.3604x	0.9930	0.84	0.720-0.960	26.93
SZ	y=5.5583+1.3699x	0.9806	0.39	0.310-0.490	12.66
TL	y=5.1739+1.1391x	0.9828	0.70	0.560-0.880	22.77
854	y=5.1552+1.4555x	0.9931	0.78	0.680-0.900	25.31
856	y=5.0133+1.3016x	0.9895	0.98	0.800-1.190	31.61

表2 黑龙江省不同萤蔺种群ALS基因突变位点

Table 2 Comparison of mutant parts of ALS gene from different populations of *Schoenoplectus juncooides* in Heilongjiang Province

种群 Population	ALS1				ALS2			
	Pro-197		Trp-574		Pro-197		Trp-574	
	密码 Codon	氨基酸 Amino acid						
拟南芥 <i>A. thaliana</i>	CCT	Pro	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
S	CCT	Pro	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
MDJ	<u>I</u> CT	Ser	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
JSJ	<u>I</u> CT	Ser	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
TY	<u>I</u> CT	Ser	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
HL	<u>I</u> CT	Ser	<u>T</u> TG	Leu	CCT	Pro	TGG	Trp
SZ	CCT	Pro	TGG	Trp	<u>C</u> TT	Leu	TGG	Trp
TL	CCT	Pro	<u>T</u> TG	Leu	CCT	Pro	TGG	Trp
854	CCT	Pro	<u>T</u> TG	Leu	CCT	Pro	TGG	Trp
856	CCT	Pro	<u>T</u> TG	Leu	<u>A</u> CT	Thr	TGG	Trp

下划线处表示被取代的碱基。Pro: 脯氨酸; Trp: 色氨酸; Ser: 丝氨酸; Leu: 亮氨酸; Thr: 苏氨酸。The substituted bases are shown underlined. Pro: Proline; Trp: tryptophan; Ser: serine; Leu: leucine; Thr: threonine.

3 讨论

本研究结果表明黑龙江省8个萤蔺抗性种群对丙嗪嘧磺隆已产生了不同水平的抗性,其中856种群的抗性指数为31.61;856种群的高抗水平与邓维(2017)在播娘蒿*Descurainia sophia*上的研究结果一致;发生Trp-574-Leu突变的种群同属高抗水平,与袁雪等(2017)在反枝苋*Amaranthus retroflexus*上报道结果一致。表明ALS基因突变是萤蔺对丙嗪嘧磺隆产生抗药性的主要原因之一。

tant flaxweed (*Descurainia sophia* L.) and effects of resistance-endowing mutations on ALS functionality. Ph. D Thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [邓维. 2017. 抗苯磺隆播娘蒿抗性机理及抗性突变对乙酰乳酸合成酶功能影响. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]

Yuan X, Huang ZF, Huang HJ, Wei SH, Zhang CX, Zhao CS. 2017. Resistance level of redroot pigweed *Amaranthus retroflexus* L. to thifensulfuron-methyl in Heilongjiang Province and its molecular resistance mechanism. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 527-528 (in Chinese) [袁雪, 黄兆峰, 黄红娟, 魏守辉, 张朝贤, 赵长山. 2017. 黑龙江省反枝苋对噻吩磺隆的抗性水平及其分子机制. *植物保护学报*, 44(3): 527-528]

参考文献 (References)

Deng W. 2017. The resistance mechanisms of tribenuron-methyl-resis-

(责任编辑:张俊芳)