

稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗药性水平及抗性机理分析

刘 健 房加鹏 董立尧*

(南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095)

摘要: 为明确东北稻区稻稗 *Echinochloa oryzoides* HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗性水平及抗性机制, 采用整株生物测定法测定稻稗种群对五氟磺草胺的敏感性, 明确抗性种群的交互抗性和多抗性情况, 研究 3 种细胞色素 P450 抑制剂对其敏感性的影响; 并应用分子生物学方法进行稻稗的乙酰乳酸合酶 (acetolactate synthase, ALS) 离体活性测定、ALS 基因序列分析及其表达量测定。结果表明: 在东北稻区, 五氟磺草胺对稻稗 HJHL-715 种群鲜重的抑制中剂量 GR_{50} 为 62.53 g/hm^2 ; 稻稗 HJHL-715 的 ALS 基因序列中未发现氨基酸突变, 其 ALS 离体活性与敏感种群的 ALS 离体活性无显著性差异, ALS 基因表达量显著低于敏感种群。1-氨基苯并三唑 (1-aminobenzotriazole, ABT)、胡椒基丁醚 (piperomyl butoxide, PBO)、马拉硫磷 3 种 P450 抑制剂显著提高了稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的敏感性, 使其对五氟磺草胺的 GR_{50} 由原来的 62.53 g/hm^2 分别下降到 5.78、5.02、 3.53 g/hm^2 。表明东北稻区已经出现了五氟磺草胺具有高水平抗性的稻稗种群, 稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗性很可能是由细胞色素 P450 介导的代谢增强所致。

关键词: 稻稗; 五氟磺草胺; 乙酰乳酸合酶; P450 代谢

Analysis of the resistance level and its mechanism of barnyard grass *Echinochloa oryzoides* population HJHL-715 to penoxsulam

LIU Jian FANG Jiapeng DONG Liyao*

(Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, College of Plant Protection, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China)

Abstract: To clarify the resistance of barnyard grass *Echinochloa oryzoides* population HJHL-715 to penoxsulam and its resistance mechanism in northeast China, whole-plant pot bioassays were conducted to determine the sensitivity of *E. oryzoides* to penoxsulam, and to explore its cross-resistance and multi-resistance patterns and the effects of three cytochrome P450 inhibitors on its sensitivity to penoxsulam. The ALS gene sequence analysis, ALS gene expression and *in vitro* acetolactate synthase activity of *E. oryzoides* were investigated by molecular biological methods. The fresh quality inhibition medium dose (GR_{50}) of the population HJHL-715 to penoxsulam in northeast China was 62.53 g/hm^2 , showing the high resistance level. No amino acid substitutions were found through the alignment of ALS gene sequences. There was no significant difference in the *in vitro* ALS activity between sensitive and resistant populations. Resistant populations had lower gene expression levels of ALS than sensitive populations. Three P450 inhibitors including 1-aminobenzotriazole (ABT), piperomyl butoxide (PBO) and malathion significantly increased the sensitivity of population HJHL-715 to penoxsulam. The GR_{50} of the population

HJHL-715 decreased significantly from 62.53 g/hm² to 5.78, 5.02, and 3.53 g/hm², respectively. These results suggested that the resistance of *E. oryzoides* population HJHL-715 to penoxsulam in northeast China was mostly due to enhanced herbicide metabolism, possibly via cytochrome P450.

Key words: *Echinochloa oryzoides*; penoxsulam; acetolactate synthase; P450 metabolism

稻稗 *Echinochloa oryzoides* 中文学名水田稗, 是一种世界范围内危害严重的水稻田伴生杂草。东北是我国重要的商品粮生产基地, 其水稻种植面积约占全国水稻种植面积的 15%, 水稻年产量约占全国水稻总产量的 11% (谢立勇等, 2011)。稻田杂草危害作为影响水稻产量的一个重要因素, 始终制约着东北地区的水稻生产, 近年来稻稗已上升为该地区稻田的最主要杂草之一。对于稻稗的田间治理, 化学防除仍是最重要的手段, 五氟磺草胺是目前水稻田防除稗草的特效药剂, 该药剂是一种乙酰乳酸合酶 (acetolactate synthase, ALS) 抑制剂类除草剂。关于稗属杂草对五氟磺草胺的抗性已有研究报道, 如 Norsworthy et al. (2014) 在美国阿肯色州发现高度抗五氟磺草胺的稗草生物型, 相对抗性倍数已达到 33.60; Iwakami et al. (2015) 在日本发现了多个抗五氟磺草胺和双草醚的稗种群; 单国侠等 (2015) 和李俭等 (2015) 也报道了在我国东北地区有抗五氟磺草胺的稻稗生物型。因此, 明确东北地区稻稗对五氟磺草胺的抗药性水平, 分析其抗性机理对于该地田间稻稗的治理尤为重要。

植物体对 ALS 抑制剂类除草剂的抗性机理通常分成靶标抗性 (target-site resistance, TSR) 和非靶标抗性 (non-target-site resistance, NTSR) 2 类 (Ghanizadeh & Harrington, 2017)。目前关于杂草对 ALS 抑制剂的靶标抗性研究较多, 抗性机制主要分为 3 方面, 包括靶标酶基因突变、靶标酶活性改变以及靶标酶基因表达量上调; 非靶标抗性主要涉及 3 种机制 (Délye, 2013), 包括杂草减少除草剂的渗透和转运、杂草提高除草剂在体内的代谢效率和杂草增强抗氧化保护机制 (Délye et al., 2011)。已有学者证实采自美国加利福尼亚州后在日本繁育的稻稗, 对包括五氟磺草胺在内的多种 ALS 抑制剂类除草剂的抗性与其体内细胞色素 P450 基因家族 *CYP81A12* 和 *CYP81A21* 基因的过量表达相关 (Yun et al., 2005; Iwakami et al., 2014a, b)。目前尚未有关于稻稗对五氟磺草胺的靶标抗性机理的系统性研究。

本研究拟通过对抗五氟磺草胺稻稗的交互抗性 with 多抗性测定, 明确东北稻区稻稗对五氟磺草胺的抗性情况; 并且通过对稻稗的 ALS 基因序列、ALS 离

体活性、ALS 基因表达量的研究, 系统性地探究稻稗对五氟磺草胺抗性的靶标酶机制; 再通过分析 3 种 P450 抑制剂处理下稻稗对五氟磺草胺的敏感性, 确定我国东北地区稻稗对五氟磺草胺的抗性是否与细胞色素 P450 代谢相关, 以期田间抗性稻稗的防控和合理用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 稻稗抗性种群 HJHL-715 于 2017 年采自黑龙江省虎林市八五六农场二区, 敏感种群 HRSH-538 于 2015 年采自黑龙江农垦总局红卫农场八区, 种子采集后置于阴凉处自然风干, 随后装入种子袋中, 将其储存在 4℃ 冰箱里待用, 每年繁种以保持种子活力。

药剂: 25 g/L 五氟磺草胺 (penoxsulam) 油悬浮剂、7.5% 啶磺草胺 (pyroxsulam) 水分散粒、100 g/L 氰氟草酯 (cyhalofop-butyl) 乳油剂、3% 氯氟吡啶酯 (florpyrauxifen-benzyl) 乳油, 美国陶氏益农公司; 5% 咪唑乙烟酸 (imazethapyr) 水剂, 山东先达农化股份有限公司; 35% 氟唑磺隆 (flucarbazone-sodium) 水分散粒剂, 爱利思达生命科学公司; 100 g/L 丙嗪嘧磺隆 (propyrisulfuron) 悬浮剂, 日本住友化学株式会社; 10% 双草醚 (bispiribac-sodium) 悬浮剂, 江苏富田农化有限公司; 50% 丙草胺 (pretilachlor) 乳油, 美丰农化有限公司; 10% 噁唑酰草胺 (metamifop) 乳油, 美国富美实公司。

试剂及仪器: 焦磷酸硫酸素、黄素腺嘌呤二核苷酸钠盐, 上海瑞永生物科技有限公司; 乙偶姻, 上海阿拉丁试剂有限公司; 胡椒基丁醚 (piperonyl butoxide, PBO), 山东西亚化学工业有限公司; 1-氨基苯并三唑 (1-aminobenzotriazole, ABT), 日本 Chemical Industry; 马拉硫磷, 美国 Accu Standard 公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305)、RNA Simple 总 RNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser for Perfect Real Time、SYBR® Premix Ex Taq™ II、Mini-BEST agarose gel DNA extraction 试剂盒, 大连宝生物科技有限公司, Phanta® Max Super-Fidelity DNA

Polymerase 试剂盒, pMD19-T载体, 南京诺唯赞生物科技有限公司。3WPSH-500D型生测喷雾塔, 农业部南京农业机械化研究所; Avanti J-HC 高速离心机, 美国 Beckman 公司; UV-2550 紫外分光光度计, 日本株式会社岛津制作所; Fresco 21 冷冻台式离心机, 美国赛默飞世尔科技有限公司; Thermal Cycler Dice™ Gradient PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司; GelDoc-It™ 310 凝胶成像仪, 美国 UVP 公司; DYY-2C 型电泳仪, 北京六一仪器厂; 7500 Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪, 美国应用生物系统公司; 96 孔酶标板, 康宁生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的敏感性测定

参照 Chen et al. (2017) 温室整株生物测定法进行稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的敏感性测定。将取自南京市郊的农田土与有机栽培基质按质量比 1:1 混匀过筛并高温灭菌后, 装于长 9 cm×宽 9 cm×高 10 cm 的方形塑料盆钵内至 3/4 处, 加水浸湿, 分别播种 HRSH-538 和 HJHL-715 种群种子, 每盆播种种子 25 粒, 表面覆盖 1 cm 土层。将其置于 30℃/25℃(光/暗温度)、12 h/12 h(光/暗时间)、光强度 12 000 lx、相对湿度 85% 条件下培养, 定时补水。种子播种约 10 d 后稻稗出苗, 将其定苗至每盆 13 株, 待其长到 3 叶期时, 对其喷施五氟磺草胺, 对 HRSH-538 种群的施药剂量为 1.88、3.75、7.5、15、30 g/hm²; 对 HJHL-715 种群的施药剂量为 3.75、7.5、15、30、60 g/hm²。药剂配制时根据喷雾塔施药面积及用水量, 计算出母液用量, 之后采用倍比稀释法得到不同浓度的药剂。施药后 1 h 将稻稗放回培养箱中继续培养。以清水喷雾为对照, 每处理 4 个重复。施药后 20 d 称量稻稗地上部鲜重, 采用 R 软件计算各处理的 GR₅, GR₅₀ 表示抑制植物生物量 50% 的剂量。选用 Log-Logistic 模型分析试验数据 (Seefeldt et al., 1995), 拟合方程为: $y=c+\{(d-c)/[1+(x/E)^b]\}$, 式中 y 为处理鲜重相对于对照鲜重的百分比; c 为鲜重抑制率的下限; d 为鲜重抑制率的上限; b 为斜率; x 为除草剂剂量; E 为 GR₅₀, 鲜重抑制率=(对照鲜重-处理鲜重)/对照鲜重×100%; 并计算相对抗性倍数(resistance index, RI), RI =抗性稻稗种群的 GR₅₀/敏感稻稗种群的 GR₅₀。

1.2.2 稻稗 HJHL-715 种群交互抗性或多抗性的测定

稻稗 HJHL-715 种群的交互抗性测定: 选取与三唑并嘧啶类(triazolopyrimidines, TP)的五氟磺草胺同种作用机理的 5 种药剂, 包括咪唑啉酮类(imid-

azolinones, IMI) 的咪唑乙烟酸、磺酰胺羰基三唑啉酮类(sulfonylaminocarbonyltriazolinone, SCT) 的氟唑磺隆、磺酰脲类(sulfonylureas, SU) 的丙嗪磺隆、嘧啶水杨酸类(pyrimidinylsalicylic acids, PTB) 的双草醚和 TP 类的啶磺草胺。播种 HRSH-538 和 HJHL-715 种群种子约 10 d 后稻稗出苗, 将其定苗至每盆 13 株, 待其长到 3 叶期时, 对其喷施药剂。HRSH-538 和 HJHL-715 种群喷施的 5% 咪唑乙烟酸水剂剂量分别为 4.69、9.38、18.75、37.5、75 g/hm² 和 9.38、18.75、37.5、75、150 g/hm²; 35% 氟唑磺隆水分散粒剂剂量分别为 2、4、8、16、32 g/hm² 和 4、8、16、32、64 g/hm²; 100 g/L 丙嗪磺隆悬浮剂剂量分别为 5.16、10.31、20.63、41.25、82.5 g/hm² 和 10.31、20.63、41.25、82.5、165 g/hm²; 10% 双草醚悬浮剂剂量分别为 1.88、3.75、7.5、15、30 g/hm² 和 3.75、7.5、15、30、60 g/hm²; 7.5% 啶磺草胺水分散粒剂剂量分别为 0.70、1.41、2.81、5.63、11.25 g/hm² 和 1.41、2.81、5.63、11.25、22.5 g/hm²。以清水喷雾为对照, 施药后 20 d 称量稻稗地上部鲜重, 每处理 4 个重复。采用 R 软件计算各处理的 GR₅₀, 计算方法同 1.2.1。分析稻稗 HJHL-715 种群对不同药剂的交互抗性。

稻稗 HJHL-715 种群的多抗性测定: 选取与五氟磺草胺不同作用机理的 4 种药剂, 包括乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC) 抑制剂的氰氟草酯、噁唑啉草胺、细胞分裂抑制剂类的丙草胺和新型药剂氯氟吡啶酯。播种 HRSH-538 和 HJHL-715 种群种子约 10 d 后稻稗出苗, 将其定苗至每盆 13 株, 待其长到 3 叶期时, 对其喷施药剂。HRSH-538 和 HJHL-715 种群喷施的 100 g/L 氰氟草酯乳油剂量分别为 4.69、9.38、18.75、37.5、75 g/hm² 和 9.38、18.75、37.5、75、150 g/hm²; 10% 噁唑啉草胺乳油剂量分别为 5.63、11.25、22.5、45、90 g/hm² 和 11.25、22.5、45、90、180 g/hm²; 50% 丙草胺乳油剂量分别为 28.13、56.25、112.5、225、450 g/hm² 和 56.25、112.5、225、450、900 g/hm²; 3% 氯氟吡啶酯乳油剂量分别为 0.94、1.88、3.75、7.5、15 g/hm² 和 1.88、3.75、7.5、15、30 g/hm²。以清水喷雾为对照, 施药后 20 d, 称量稻稗地上部鲜重, 每处理 4 个重复。采用 R 软件计算各处理的 GR₅₀, 计算方法同 1.2.1。分析稻稗 HJHL-715 种群对不同药剂的多抗性。

1.2.3 HJHL-715 种群 ALS 基因的克隆与序列分析

按 1.2.1 中培养条件培养稻稗, 待其长至 3~4 叶期时, 取单株稻稗的鲜嫩组织, 用植物基因组 DNA 试剂盒提取稻稗基因组 DNA。由于稻稗是四倍体

植物,故其基因很有可能存在多拷贝,根据NCBI上稻稗ALS基因序列(登录号AB636580和AB636581),利用Primer Premier 5.0软件设计用于扩增稻稗ALS基因全长的2对引物,分别为ALS-1(F: 5'-AATCCCCCATCCTCTCC-3'/R: 5'-TCAATACACG-GTCCTGC-3')和ALS-2(F: 5'-CCACCCTCCCCAA-ACC-3'/R: 5'-GCACCACTCGCTGAAA-3'),引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。50 μ L PCR反应体系:模板DNA 2.5 ng、10 μ mol/L上下游引物各2 μ L、2 $\times$ Phanta Max缓冲液(含有终浓度为2 mmol/L的Mg²⁺)25 μ L、高保真DNA聚合酶1 μ L、dNTP Mix 2 μ L,加ddH₂O至终体积为50 μ L。PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性4 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火(每循环降0.5 $^{\circ}$ C)15 s,72 $^{\circ}$ C延伸75 s,20个循环;95 $^{\circ}$ C变性15 s,50 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸75 s,15个循环;72 $^{\circ}$ C总延伸10 min。将经过1%凝胶电泳检测的PCR产物用MiniBEST agarose gel DNA extraction kit进行回收,经连接、转化、克隆至pMD19-T载体。为了尽可能多的得到稻稗ALS基因的不同拷贝,每个种群选取6个单株DNA样本,每个DNA样本至少选取8个单克隆菌株,将经过PCR鉴定的新鲜菌液送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行双向测序并拼接,使用BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5软件进行序列比对。

1.2.4 稻稗HJHL-715种群ALS离体活性测定

根据Yu & Powles(2004)方法测定不同稻稗种群ALS离体活性,并略做改进。用五氟磺草胺原药配制浓度为0.005、0.05、0.5、5、50、500、5 000 mmol/L的药剂。按1.2.1中的培养条件培养稻稗,待其长至3~4叶期时,取4 g叶片组织,在研钵中用液氮迅速研磨成粉,加入4 mL酶提取液(含5 mmol/L氯化镁、0.5 mmol/L焦磷酸硫酸素、0.1 mmol/L黄素腺嘌呤二核苷酸、10 mmol/L丙酮酸钠的pH 7.5的磷酸缓冲液),置于冰上过滤至离心管中,4 $^{\circ}$ C下27 000 g离心20 min,取上清液转移至新的离心管中,置于冰上缓慢滴加等体积的饱和硫酸美溶液,4 $^{\circ}$ C下27 000 g离心30 min,弃上清液。向管中加入4 mL酶提取液,溶解沉淀,获得粗酶液。向1.5 mL离心管中分别加入100 μ L粗酶液、200 μ L酶反应液(含5 mmol/L氯化镁、1 mmol/L焦磷酸硫酸素、0.1 mmol/L黄素腺嘌呤二核苷酸、100 mmol/L丙酮酸钠的pH 7.5的磷酸缓冲液)、100 μ L配制好的不同浓度五氟磺草胺药液,于37 $^{\circ}$ C下反应1 h,加入10 μ L浓度为6 mol/L的硫酸溶液终止反应,于60 $^{\circ}$ C下反应15 min。再加入

现配制的肌酸溶液和 α -萘酚溶液各200 μ L,60 $^{\circ}$ C显色反应30 min。冷却后低速离心,每处理取200 μ L上清液加于96孔酶标板上,测定530 nm下吸光值A_{530nm},标准曲线用乙偶姻梯度稀释制作。乙偶姻是ALS催化途径的中间产物,可以与肌酸、 α -萘酚形成稳定的复合物并显现出粉红色,530 nm为其最大吸收波长,而ALS本身较不稳定,很难直接测定其离体活性。因此,通过检测乙偶姻与肌酸、 α -萘酚形成的复合物的A_{530nm}值来确定乙偶姻的积累差异,并计算各种群抑制中浓度(IC₅₀),以间接测定的方式研究ALS离体活性。IC₅₀的计算方法同1.2.1中GR₅₀的计算方法。生物学重复3次,技术重复2次。

1.2.5 稻稗HJHL-715种群ALS基因表达量测定

按1.2.1中培养条件培养稻稗,待其长至2~3叶期时,取幼嫩组织3 g,按总RNA提取试剂盒说明提取稻稗基因组RNA,反转录获得稻稗的第一链cDNA。以稻稗ALS全长基因作为模板,在网站(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计荧光定量PCR引物(F: 5'-TGGGGCTATGGGATTTGGTT-3'/R: 5'-GCA-CA-AAGACCTTCACTGGG-3'),将肌动蛋白 β -actin作为内参基因(F: 5'-CACACTGGTGTTCATGG-TAGG-3'/R: 5'-AGAAAGTGTGATGCCAGAT-3')。20 μ L荧光定量PCR反应体系:模板cDNA 2.5 ng、10 μ mol/L上下游引物各0.4 μ L、2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L,加ddH₂O至终体积为20 μ L。荧光定量PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,40个循环。定量PCR采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法分析ALS基因表达量。技术重复和生物学重复各2次。

1.2.6 抑制剂对稗草五氟磺草胺抗性的影响

采用整株生物测定法测定3种P450抑制剂处理下HJHL-715种群对五氟磺草胺的敏感性。稻稗植株培养条件同1.2.1,待稻稗长至3~4叶期时,根据预试验结果对HJHL-715和HRSH-538种群进行药剂处理,P450抑制剂ABT、PBO和马拉硫磷处理剂量分别为1 000、4 200、1 000 g(a.i.)/hm²。喷施后静置1 h,再喷施五氟磺草胺。五氟磺草胺剂量设置同1.2.1。以无抑制剂五氟磺草胺处理组为对照,处理后17 d测定植株地上部鲜重量,计算各处理组稻稗种群对五氟磺草胺的GR₅₀,计算方法同1.2.1。生物学重复4次,技术重复2次。

1.3 数据分析

数据通过DPS 15.10和Excel 2010进行统计分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著

性检验。

2 结果与分析

2.1 HJHL-715种群对五氟磺草胺的敏感性

稻稗HJHL-715种群对五氟磺草胺的敏感性测定结果表明,该种群对五氟磺草胺已产生了抗药性,其GR₅₀达到了62.53 g/hm²,已是该药剂田间推荐剂量30.00 g/hm²的2.08倍;同时相对于敏感种群

HRSH-538的GR₅₀(1.77 g/hm²),HJHL-715种群的相对抗性倍数已经达到35.33。

2.2 抗五氟磺草胺稗草的交互抗性与多抗性

对抗五氟磺草胺的稻稗HJHL-715种群的交互抗性测定结果显示,HJHL-715种群对咪唑乙烟酸和双草醚仍较为敏感;HJHL-715种群对氟唑磺隆、丙噻唑磺隆以及啶磺草胺则都产生了抗性,其GR₅₀值均高于药剂田间推荐剂量的2.00倍(表1)。

表1 供试稻稗种群的交互抗性与多抗性测定结果

Table 1 Cross-resistance and multi-resistance determination results of tested *Echinochloa oryzoides* populations

		推荐 剂量	HRSH-538		HJHL-715		相对 抗性 倍数	
类型	除草剂	Recom- mended dose/ (g/hm ²)	GR ₅₀ / (g/hm ²)	<i>P</i>	GR ₅₀ / (g/hm ²)	<i>P</i>	Resis- tance in- dex	
Type	Herbicide							
ALS抑制剂	5% 咪唑乙烟酸水剂	5% imazethapyr AS	75.00	4.02	0.01	25.84	<0.01	6.43
ALS inhibitors	35% 氟唑磺隆水分散粒剂	35% flucarbazone-sodium WDG	32.00	3.97	0.01	>64.00	<0.01	>16.12
	100 g/L 丙噻唑磺隆悬浮剂	100 g/L propyrisulfuron SC	82.50	10.41	<0.01	>165.00	<0.01	>15.85
	10% 双草醚悬浮剂	10% bispyribac-sodium SC	30.00	4.68	<0.01	8.94	0.01	1.91
	7.5% 啶磺草胺水分散粒剂	7.5% pyroxsulam WDG	11.25	0.88	<0.01	>22.50	<0.01	>25.57
ACC抑制剂	100 g/L 氰氟草酯乳油	100 g/Lcyhalofop-butyl EC	75.00	14.19	<0.01	>150.00	<0.01	>10.57
ACC inhibitors	10% 噁唑酰草胺乳油	10% metamifop EC	90.00	7.74	<0.01	61.66	0.01	7.97
细胞分裂抑制剂	50% 丙草胺乳油	50% pretilachlor EC	450.00	37.23	<0.01	455.44	0.01	12.23
Cell division inhibitors								
作用机理不明	3% 氯氟吡啶酯乳油	3% florypyrauxifen-benzyl EC	15.00	3.45	<0.01	>30.00	<0.01	>8.70
Unknown								

对抗五氟磺草胺的稻稗HJHL-715种群的多抗性测定结果显示,结果表明,HJHL-715种群对氰氟草酯和噁唑酰草胺,丙草胺以及氯氟吡啶酯均产生了不同程度的多抗性,相对抗性倍数范围在7.97~12.23倍之间(表1)。

2.3 稻稗HJHL-715种群ALS基因序列分析

采用2对引物扩增了稻稗中ALS的完整编码序列,对扩增得到的ALS序列进行BLAST比对分析,结果显示扩增所得的ALS序列与稻稗ALS序列(登录号AB636580、AB636581)的相似度为98%~99%,表明本研究扩增的稻稗ALS基因完整编码序列正确。通过BioEdit比对,分别在HSRH-538和HJHL-715种群中得到2个不同的ALS序列,表明稻稗ALS基因中存在2种不同的ALS序列拷贝(表2)。通过使用BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5软件进行序列比对分析后,发现HSRH-538和HJHL-715种群的ALS序列中存在单核苷酸多态性,即在同一种群内存在不同的ALS基因拷贝。然而在不同种群

的同一拷贝之间的比对结果表明,在稻稗抗性种群HJHL-715的ALS基因序列中未发现任何氨基酸突变。

2.4 稻稗HJHL-715的ALS离体活性分析

离体条件下五氟磺草胺对稻稗HJHL-715种群ALS活性的抑制中浓度IC₅₀为26.64 μmol/L,而对HSRH-538种群的IC₅₀为16.70 μmol/L,但两者间无显著差异,抗性种群的IC₅₀为敏感种群的1.60倍。说明2个种群ALS离体活性无显著差异,HJHL-715种群对五氟磺草胺的抗药性不是由靶标酶变化导致的。

2.5 稻稗HJHL-715种群ALS基因表达量分析

经五氟磺草胺处理后,敏感种群HSRH-538和抗性种群HJHL-715的ALS基因表达量的变化趋势一致,在第1天表达量就开始上调,到第3天到达最大值,分别为对照的10.04倍和1.43倍,之后又开始回落;但敏感种群的变化幅度显著大于抗性种群(图1)。

表2 同一供试稻稗种群不同拷贝间多个位点的单核苷酸多态性
Table 2 The single nucleotide polymorphisms in multiple sites of *ALS* sequences in the same tested *Echinochloa oryzoides* population

基因 Gene	氨基酸位点 Amino acid site							
	235		283		318		441	
	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid
HSRH-538 <i>ALS-1</i>	ATA	异亮氨酸 Isoleucine	CAT	组氨酸 Histidine	CGC	精氨酸 Arginine	CAA	谷氨酰胺 Glutamine
<i>ALS-2</i>	GTG	缬氨酸 Valine	CCT	脯氨酸 Proline	TGC	半胱氨酸 Cysteine	CAC	组氨酸 Histidine
HJHL-715 <i>ALS-1</i>	ATA	异亮氨酸 Isoleucine	CAT	组氨酸 Histidine	CGC	精氨酸 Arginine	CAA	谷氨酰胺 Glutamine
<i>ALS-2</i>	GTG	缬氨酸 Valine	CCT	脯氨酸 Proline	TGC	半胱氨酸 Cysteine	CAC	组氨酸 Histidine

氨基酸位点编号以拟南芥 *ALS* 基因氨基酸编号为模板。Amino acid sites are numbered on the basis of the corresponding sequence of *Arabidopsis thaliana*.

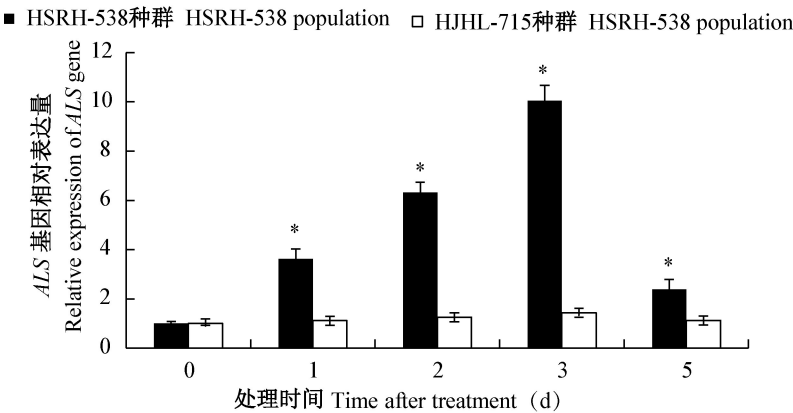


图1 五氟磺草胺处理后敏感种群和抗性种群的 *ALS* 基因相对表达量
Fig. 1 Relative expression of *ALS* gene in sensitive and resistant populations after treatment with penoxsulam
图中数据为平均数±标准差。*表示同一处理时间下2个种群之间经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. * indicates significant difference between the two populations at the same treatment time at $P<0.05$ level by LSD test.

2.6 P450 抑制剂对 HJHL-715 种群敏感性的影响
为 5.78、5.02、3.53 g/hm²；相对抗性倍数从原来的 35.33 分别降到 5.21、4.08、3.33，降幅分别为 90.76%、91.97% 和 94.35% (表 3)。说明 P450 抑制剂对稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗性有显著影响。

喷施 P450 抑制剂 ABT、PBO、马拉硫磷后，再用五氟磺草胺处理，相比直接喷施五氟磺草胺显著降低，HJHL-715 种群的 GR₅₀ 从 62.53 g/hm² 分别下降

表3 P450 抑制剂处理下供试稻稗种群对五氟磺草胺的敏感性测定结果
Table 3 Sensitivity of the tested *Echinochloa oryzoides* populations to penoxsulam treated with different P450 inhibitors

处理 Treatment	HSRH-538		HJHL-715		相对抗性倍数 Resistance index
	GR ₅₀ /(g/hm ²)	<i>P</i>	GR ₅₀ /(g/hm ²)	<i>P</i>	
五氟磺草胺 Penoxsulam (CK)	1.77±0.74 a	<0.01	62.53±21.54 a	<0.01	35.43
ABT+五氟磺草胺 ABT+penoxsulam	1.11±0.42 b	<0.01	5.78±1.67 b	<0.01	5.21
PBO+五氟磺草胺 PBO+penoxsulam	1.23±0.51 b	<0.01	5.02±1.38 b	<0.01	4.08
马拉硫磷+五氟磺草胺 Malathion+penoxsulam	1.06±0.38 b	0.01	3.53±0.95 b	<0.01	3.33

ABT: 1-氨基苯并三唑; PBO: 胡椒基丁醚。ABT: 1-aminobenzotriazole; PBO: piperomyl butoxide.
表中 GR₅₀ 数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。The GR₅₀ values in the table are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by LSD test.

3 讨论

稗属杂草对五氟磺草胺的抗性已成为全世界关注的问题,如王晓琳等(2017)在我国湖北省发现了相对抗性倍数为 13.50 的抗五氟磺草胺稗草;Fang et al. (2019)在江苏省发现了相对抗性倍数达到 33.33 的稗草。本研究选取了在我国较有代表性的东北稻区的稻稗种群进行研究,对五氟磺草胺的敏感性测定结果显示,稻稗 HJHL-715 种群的抗性倍数是敏感种群的 35.55 倍,其对五氟磺草胺已经达到了高抗水平(Beckie & Tardif, 2012),与王晓琳等(2017)、Fang et al. (2019)等的研究结论相似,可见稻稗对五氟磺草胺的抗性已日趋严重。

杂草对 ALS 抑制剂产生抗性的主要原因是其 ALS 基因序列发生突变,导致氨基酸发生变化,从而影响抑制剂和乙酰乳酸合酶的结合作用。目前,在植物体内已经被报道证实的与抗性相关的 ALS 基因的常规突变位点共有 8 个(Yu & Powles, 2014)。其中 122、574 和 653 这 3 个突变位点已经在稗属杂草中被证实。Matzenbacher et al. (2015)发现稗草 ALS 基因的 574 位和 653 位突变导致其对 IMI 类除草剂产生了抗性;Panozzo et al. (2013)发现稗草 122 位突变和 574 位突变导致其对五氟磺草胺和甲氧咪草烟产生了抗性;Riar et al. (2013)和 Panozzo et al. (2017)则发现稗草 122 位突变引发了其对甲氧咪草烟、双草醚和五氟磺草胺的抗性。稻稗作为四倍体植物,初步猜想其 ALS 基因具有多拷贝性,因此本研究进行了克隆试验,并最终得到了 2 条显现出单核苷酸多态性的不同拷贝, Iwakami et al. (2012)也同样发现稻稗的 ALS 基因具有 2 条拷贝,与本研究结论相同。但是,在本研究的稻稗抗性种群 HJHL-715 的 ALS 基因中未发现任何突变位点,这与 Iwakami et al. (2012)的研究结果也一致,说明稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗性不是由靶标酶氨基酸突变引起的。

本研究结果显示,稻稗抗性种群 ALS 离体活性测定得到的相对抗性倍数(1.60)远低于整株生测结果得到的相对抗性倍数(35.33),推测导致稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺产生抗性的主要原因并不是 ALS 离体活性差异引起的;虽然交互抗性生测结果显示,稻稗 HJHL-715 种群对 TP、SU、SCT 类的 ALS 抑制剂表现出了不同程度的抗药性,而对 PTB 和 IMI 类的双草醚和咪唑乙烟酸仍很敏感,但这并不能确定是靶标酶变化导致的抗性情况。因为

杂草对于 ALS 抑制剂的抗性往往十分复杂,还可能与杂草种类、除草剂化学结构、用药历史等相关(Yu & Powles, 2014)。HJHL-715 种群所在的东北地区水稻田,多年来经常施用 TP、SU、SCT 类除草剂,而 PTB 类除草剂则使用较少,且 IMI 类除草剂对水稻有药害问题,因此稻稗 HJHL-715 种群仍旧对 PTB 和 IMI 类的双草醚和咪唑乙烟酸敏感。

本研究首次测定了抗五氟磺草胺稻稗的 ALS 基因表达量,结果显示,敏感种群 HRSH-538 的 ALS 基因表达量的上调幅度比抗性种群 HJHL-715 要高,说明 ALS 基因表达量变化并不是导致稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺产生抗性的原因。而造成敏感种群 ALS 基因表达量相对抗性种群显著上调的原因可能有 2 种:第一,这是种群间自然存在的差异;第二,抗性种群有其它抗性机制。综合来看,第二种原因的可能性更大,因为通过 ALS 基因序列分析、ALS 离体活性测定以及 ALS 基因表达量测定的结果可以说明,HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗性不是由靶标酶变化导致的,然而该种群又确实存在对五氟磺草胺明显的抗性,因此该种群极有可能存在非靶标抗性机理。与本研究结果相似的案例也有报道,Yasuor et al. (2009)对美国加利福尼亚州的抗五氟磺草胺稻稗进行研究后发现,稻稗抗性种群的 ALS 离体活性仅为敏感种群的 1.6 倍,然而经细胞色素 P450 抑制剂处理后,抗性种群对药剂的敏感性显著提升,而经细胞色素 P450 诱导剂处理后,抗性种群对药剂的敏感性又显著下降,表明该地区稻稗对五氟磺草胺的抗性很可能是由细胞色素 P450 氧化酶系介导的代谢抗性。

非靶标抗性中细胞色素 P450 介导的代谢抗性是目前报道最多的。本研究发现,稻稗在 P450 抑制剂处理后对五氟磺草胺的抗性显著降低,即抗性稻稗体内的细胞色素 P450 氧化酶系受到抑制后,对五氟磺草胺的敏感性显著增加。这可能是因为抗性种群体内的细胞色素 P450 氧化酶系受到抑制后,导致其体内对五氟磺草胺的代谢作用减弱(Iwakami et al., 2014a, b)。多抗性研究结果表明,HJHL-715 种群对 ACC 抑制剂、细胞分裂抑制剂等作用机制在内的多种除草剂产生了抗性,可以推测其抗性机制很可能是非靶标酶抗性中的代谢抗性导致。综上所述,细胞色素 P450 氧化酶系介导的代谢抗性可能是稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺产生抗性的重要机制。至于其具体的抗性机制,由于细胞色素 P450 家族的相关基因多达数百个,还需要进一步深入研究。

参考文献 (References)

- BECKIE HJ, TARDIF FJ. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35: 15–28
- CHEN G, WANG L, XU H, WU X, LANG P, DONG L. 2017. Cross-resistance patterns to acetyl-CoA carboxylase inhibitors associated with different mutations in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Weed Science*, 65(4): 1–8
- 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, GARDIN JAC, BOUCANSAUD K, CHAUVEL B, PETIT C. 2011. Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. *Weed Research*, 51(5): 433–437
- FANG J, LIU T, ZHANG Y, LI J, DONG L. 2019. Target site-based-penoxsulam resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) from China. *Weed Science*, 67: 281–287
- GHANIZADEH H, HARRINGTON KC. 2017. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, (4): 1–11
- IWAKAMI S, ENDO M, SAIKA H, OKUNO J, NAKAMURA N, YOKOYAMA M, WATANABE H, TOKI S, UCHINO A, TATSUYA I. 2014b. Cytochrome P450 *CYP81A12* and *CYP81A21* are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology*, 165(2): 618–629
- IWAKAMI S, HASHIMOTO M, MATSUSHIM K, WATANABE H, HAMAMURA K, UCHINO A. 2015. Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 119: 1–8
- IWAKAMI S, UCHINO A, KATAOKA Y, SHIBAIKE H, WATANABE H, INAMURA T. 2014a. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, 70(4): 549–558
- IWAKAMI S, UCHINO A, WATANABE H, YAMASUE Y, INAMURA T. 2012. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest Management Science*, 68(7): 1098–1106
- LI J, LI HS, CHEN K, ZHANG L, SHAN GX, WU MG. 2015. The resistance characteristics of *Echinochloa oryzicola* and *Leersia oryzoides* in paddy fields of Jilin Province. *Agricultural Science Journal of Yanbian University*, 37(1): 18–24 (in Chinese) [李俭, 李海粟, 陈凯, 张琳, 单国侠, 吴明根. 2015. 吉林省稻区稗、稻李氏禾的抗药性特征. 延边大学农学报, 37(1): 18–24]
- MATZENBACHER FO, BORTOLY ED, KALSING A, MEROTTO AJ. 2015. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. *Journal of Agricultural Science*, 153(6): 1044–1058
- NORSWORTHY JK, WILSON MJ, SCOTT RC, GBUR EE. 2014. Herbicidal activity on acetolactate synthase-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas, USA. *Weed Biology & Management*, 14(1): 50–58
- PANOZZO S, SCARABEL L, ROSAN V, SATTIN M. 2017. A new Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2042
- PANOZZO S, SCARABEL L, TRANEL PJ, SATTIN M. 2013. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 105(2): 93–101
- RIAR DS, NORSWORTHY JK, SRIVASTAVA V, NANDULA V, BOND JA, SCOTT RC. 2013. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 61(2): 278–289
- SEEFELDT SS, JENSEN JE, FUERST EP. 1995. Log-Logistic Analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9(2): 218–227
- SHAN GX, LI J, LI HS, WANG S, LIU X, WU MG. 2015. Distribution characteristics and control strategies of herbicide-resistant weeds in paddy fields in Jilin Province. *Jiangsu Agricultural Science*, 43(10): 164–167 (in Chinese) [单国侠, 李俭, 李海粟, 王爽, 刘秀, 吴明根. 2015. 吉林省稻田抗药、耐药性禾本科杂草分布特征及防控对策. 江苏农业科学, 43(10): 164–167]
- WANG XL, NIU LC, JIANG YC, ZHANG ZY, LI G. 2017. Differences in sensitivity of different barnyardgrass populations to penoxsulam. *Journal of Weed Science*, 35(1): 8–14 (in Chinese) [王晓琳, 牛利川, 蒋翊宸, 张卓亚, 李贵. 2017. 不同稗草种群对五氟磺草胺的敏感性差异. 杂草学报, 35(1): 8–14]
- XIE LY, LI Y, LIN M. 2011. Response and adaptation to climate change of agriculture and environment in Northeast China. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 19(1): 197–201 (in Chinese) [谢立勇, 李艳, 林森. 2011. 东北地区农业及环境对气候变化的响应与应对措施. 中国生态农业学报, 19(1): 197–201]
- YASUOR H, OSUNA MD, ORTIZ A. 2009. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 57(9): 3653–3660
- YU Q, FRIESEN LJS, ZHANG XQ, POWLES SB. 2004. Tolerance to acetolactate synthase and acetyl-coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 78(1): 21–30
- YU Q, POWLES SB. 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science*, 70(9): 1340–1350
- YUN MS, YOGO Y, MIURA R, YAMASUE Y, FISCHER AJ. 2005. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 83(2/3): 107–114

(责任编辑:王璇)