

广东省水稻田稗对五氟磺草胺的抗性分析

郭文磊 冯 莉 张 纯 张泰劼 吴丹丹 田兴山*

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要:为明确广东省水稻田杂草稗 *Echinochloa crus-galli* 对五氟磺草胺的抗性现状及其可能的抗性机理,采用整株剂量反应法测定不同地区稗种群对五氟磺草胺的抗性水平,对不同稗种群的乙酰乳酸合成酶 (acetolactate synthase, ALS) 基因片段进行扩增测序,分析细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 monooxygenase, P450) 和谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 抑制剂胡椒基丁醚 (piperonylbutoxide, PBO) 和 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑 (4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole, NBD-Cl) 对不同稗种群抗性水平的影响,并对替代药剂进行筛选。结果显示,广东省水稻田多数稗种群对五氟磺草胺仍表现敏感,但采自湛江市的 1 个种群 BC-7 对五氟磺草胺产生了抗性,抗性倍数达 6.5 倍。与敏感种群 BC-2 相比,BC-7 种群并未发生已报道的 ALS 靶标抗性相关突变。PBO 和 NBD-Cl 均可显著提高 BC-7 种群对五氟磺草胺的敏感性,其干重抑制中量 GR_{50} 由 31.1 g/hm² 分别降为 11.0 g/hm² 和 24.7 g/hm²。BC-7 种群对氟氯草酯和噁唑酰草胺仍较敏感,但对二氯喹啉酸和双草醚产生了抗性。表明 P450 和 GST 介导的代谢抗性是稗 BC-7 种群产生抗性的重要原因,氟氯草酯和噁唑酰草胺适用于治理该抗性种群。

关键词: 稗; 五氟磺草胺; 乙酰乳酸合成酶; 代谢抗性

Resistance of barnyard grass *Echinochloa crus-galli* to penoxsulam in rice fields in Guangdong Province

GUO Wenlei FENG Li ZHANG Chun ZHANG Taijie WU Dandan TIAN Xingshan*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: In order to specify the penoxsulam resistance status and the possible mechanisms of resistance in barnyard grass *Echinochloa crus-galli* in rice fields in Guangdong Province, whole-plant dose response experiments were conducted to determine its resistance levels to penoxsulam, and the acetolactate synthase (ALS) gene segments were amplified and sequenced. Meanwhile, the influences of cytochrome P450 monooxygenase (P450) and glutathione-S-transferase (GST) inhibitors piperonylbutoxide (PBO) and 4-chloro-7-nitro-1, 2, 3-benzoxadiazole (NBD-Cl) on its resistance levels were analyzed. In addition, the alternative herbicides for control of resistant population were selected. The results showed that most barnyard grass populations were susceptible to penoxsulam in rice fields in Guangdong Province. However, a population (BC-7) from Zhanjiang City had evolved resistance to penoxsulam, with a resistance index of 6.5. Compared with the susceptible population BC-2, no mutation concerning penoxsulam resistance was detected in BC-7 population. Both PBO and NBD-Cl could increase the susceptibility of BC-7 population to penoxsulam, which reduced the GR_{50} (herbicide dose causing growth re-

基金项目: 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队(2019KJ113), 国家自然科学基金(31901900), 科技创新战略专项资金(高水平农科院建设)(R2017YJ-YB1003)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xstian@tom.com

收稿日期: 2019-11-12

duction of dry weight by 50%) value from 31.1 g/hm² to 11.0 g/hm² and 24.7 g/hm², respectively. BC-7 population was susceptible to cyhalofop-butyl and metamifop, but resistant to quinclorac and bispyribac-sodium. This study suggests that the metabolic resistance involving P450 and GST plays an important role in penoxsulam resistance in BC-7 population. Cyhalofop-butyl and metamifop are applicable to managing the resistant population.

Key words: *Echinochloa crus-galli*; penoxsulam; acetolactate synthase; metabolic resistance

稗 *Echinochloa crus-galli* 是水稻田最常见的杂草之一,与水稻伴生导致激烈的资源竞争,据统计全球范围内因稗导致的水稻产量损失平均在 35% 左右(Oerke & Dehne, 2004; 朱文达, 2005; 张自常等, 2014)。广东省是我国水稻主产区之一,稻田中稗的发生频率达 100%,相对多度达 93.5% (陈国奇等, 2019),由于该地区光、热、水资源较丰富,且稗具有发生量大、生长速度快、生育期短等特点,若不及时进行防治,将会导致草荒,甚至使部分稻田绝收(郭文磊等, 2019)。

当前,杂草防治仍以化学防治为主,广东省稻田一般每季用药 1~2 次,防除稗的除草剂主要为苗前土壤处理剂丁草胺、丙草胺及茎叶处理剂二氯喹啉酸、五氟磺草胺、氰氟草酯等(张宏军等, 2017)。丁草胺、二氯喹啉酸由于应用历史较长,导致对稗等杂草防效下降(黄炳球等, 1995; 杨彩宏等, 2011),而五氟磺草胺可有效防除稻田稗及多数阔叶杂草和莎草,且具有高效低毒、对非靶标生物安全等特点,自 2009 年进入中国市场以来迅速成为稻田主要除草剂之一(顾林玲, 2015)。根据中国农药信息网数据库,五氟磺草胺相关原药和制剂产品登记数量已达 276 个,未来一段时期内五氟磺草胺仍将是我国稻田主要除草剂之一。五氟磺草胺作用靶标是乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS),该类除草剂作用位点单一,容易导致杂草抗药性的产生,截至目前全球已有 162 种杂草对该类药剂产生了抗性(Heap, 2019)。在我国安徽、江苏、宁夏、黑龙江、湖北等省区已有稗种群对五氟磺草胺产生抗性的报道(Chen et al., 2016; 王晓琳等, 2017; Fang et al., 2019a),但广东省稗种群对五氟磺草胺的抗性水平尚不明确。

杂草对 ALS 类除草剂产生抗性的机理主要包括靶标抗性和非靶标抗性(Powles & Yu, 2010)。靶标抗性主要指杂草 ALS 基因突变,突变型的 ALS 酶构象发生变化,除草剂与其结合能力下降,由此产生抗性(Yu & Powles, 2014a)。目前,在 ALS 基因的 8 个氨基酸位点 Ala-122、Pro-197、Ala-205、Asp-376、

Gly-377、Trp-574、Ser-653、Gly-654 已发现 28 种突变形式可导致杂草对 ALS 类除草剂产生抗性(Beckie & Tardif, 2012; Yu & Powles, 2014a),其中稗或稗属其它杂草在 Ala-122、Ala-205、Trp-574 和 Ser-653 位点已有相关抗性突变产生(Kaloumenos et al., 2013; Ri-ar et al., 2013; Fang et al., 2019a)。非靶标抗性是指杂草通过对除草剂减少吸收、改变转运方向、增强其代谢解毒能力等途径,使得到达靶标位点的除草剂量减少,从而在推荐剂量下得以存活,目前报道较多的为细胞色素 P450 酶(cytochrome P450 monooxygenase, P450)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)等介导的代谢抗性(Yuan et al., 2007; Yu & Powles, 2014b)。胡椒基丁醚(piperonylbutoxide, PBO)和 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole, NBD-Cl)分别是一种常见的 P450 和 GST 活性抑制剂,在杂草抗性研究中多集中于证实 P450 或 GST 介导的代谢抗性的存在,如 PBO 和 NBD-Cl 分别可抑制硬直黑麦草 *Lolium rigidum* 对绿麦隆的代谢和大穗看麦娘 *Alopecurus myosuroides* 对精噻唑禾草灵的代谢(Preston et al., 1996; Cummins et al., 2013; Yu & Powles, 2014b)。

本研究在广东省广州、江门、湛江等市的水稻田采集部分稗种群,通过测定稗不同地理种群对五氟磺草胺的抗性水平,从靶标抗性和非靶标抗性 2 方面对抗性种群的抗性机理进行初步分析,并筛选替代药剂,以期广东省水稻田稗的抗药性治理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试稗及土壤:稗种子于 2018 年 10 月分别采集于广州、江门、湛江等市的水稻田,选择稗发生较重区域的田块进行采样,每区域至少随机选择 1 块水稻田,每块田面积均在 667 m² 以上。采用倒置 W 九点取样法在每块田至少采集 50 株稗的种子,混匀后及时晾干,于 4℃ 保存备用。共采集 9 个种群,其中 BC-1 种群采自广州市花都区花东镇七星村,BC-2

种群采自广州市白云区钟落潭镇黎家塘, BC-3种群采自江门市新会区司前镇石名村, BC-4种群采自湛江市遂溪县黄略镇白沙村, BC-5、BC-6、BC-7种群均采自湛江市雷州市松竹镇刘宅村, BC-8种群采自茂名市茂南区坡心镇田头村, BC-9种群采自阳江市阳西县塘口镇由高村。自广州市白云区农田采集0~10 cm表层土壤供试, 质地为壤土, pH 5.87, 有机质含量2.25%。

除草剂: 25 g/L 五氟磺草胺 (penoxsulam) 可分散油悬浮剂, 美国陶氏益农公司; 50% 二氯喹啉酸 (quinclorac) 可湿性粉剂, 江苏省激素研究所股份有限公司; 100 g/L 双草醚 (bispiribac-sodium) 悬浮剂, 日本组合化学工业株式会社; 10% 氰氟草酯 (cyhalofop-butyl) 乳油, 山东绿霸化工股份有限公司; 10% 噁唑酰草胺 (metamifop) 乳油, 苏州富美实植物保护剂有限公司。

试剂和仪器: 95% PBO、98% NBD-Cl, 上海麦克林生化科技有限公司; 2×Taq PCR Mixture, 北京博奥龙免疫技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。T100 Thermal Cycler PCR 仪、PowerPac Basic 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; ASS-4 自动控制农药喷洒系统, 国家农业信息化工程技术研究中心; GenoSens 1800 系列凝胶成像分析系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; GXZ-280 型光照培养箱, 宁波江南仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 不同稗种群对五氟磺草胺的抗性水平测定

采用整株剂量反应法 (毕亚玲等, 2015) 测定采集的9个稗种群对五氟磺草胺的抗性水平。从各种群中选取均匀一致的稗种子约300粒, 置于铺有2层滤纸的直径9 cm培养皿中, 每皿加灭菌水8 mL保持湿润, 将培养皿放入光照培养箱中催芽, 光照/黑暗时长为12 h/12 h, 昼/夜温度为30℃/25℃。当芽长1 cm左右时, 移植到盛有供试土壤的直径12 cm花盆中, 每盆10株, 置于温度25~35℃、相对湿度70%~

85%、自然光照的温室中培养。于2~3叶期进行间苗, 每盆保留生长状况一致的幼苗6株。于稗3~4叶期时, 基于五氟磺草胺田间推荐剂量30 g/hm², 采用自动控制农药喷洒系统进行茎叶喷雾处理, 喷液压力为0.275 MPa, 喷液量为450 L/hm²; 药后21 d观察各种群存活情况, 并初步判断各稗种群的抗性水平。根据上述预试验结果, 五氟磺草胺剂量针对抗性种群设为0、1.1、3.3、10、30、90、270 g/hm², 针对敏感种群设为0、0.37、1.1、3.3、10、30、90 g/hm², 剂量均指有效成分用量; 以清水处理为空白对照。施药方法同上, 药后21 d剪取地上部分, 80℃恒温条件下烘干72 h至恒重后称量干重并计算相对干重, 相对干重=处理的干重/空白对照的干重×100%。采用Sigma Plot 12.5 软件四参数非线性回归模型拟合五氟磺草胺对稗各种群的干重抑制中量GR₅₀, 回归方程式为: $Y=C+(D-C)/(1+X/GR_{50})^b$, 其中Y为与空白对照对比不同处理下稗的相对干重; C为剂量反应下限; D为剂量反应上限; X为五氟磺草胺剂量; b为斜率。同时计算各种群对五氟磺草胺的抗性倍数, 抗性倍数=抗性种群GR₅₀/敏感种群GR₅₀。

1.2.2 ALS基因片段克隆与测序

基于1.2.1抗性水平测定结果, 选取抗性种群和最敏感种群, 于稗2~3叶期时, 每个种群各选10株幼苗, 采用CTAB法分别提取单株的基因组DNA (Doyle & Doyle, 1990)。获得的DNA样品于-20℃保存备用。稗为六倍体植物, 其ALS基因含有多个拷贝, 本研究参考GenBank数据库中稗ALS基因不同拷贝序列 (LC006058.1、LC006059.1、LC006061.1), 利用Oligo 7 软件在其保守区设计2对引物Ecl-F1/Ecl-R1、Ecl-F2/Ecl-R2用于稗ALS基因片段的扩增 (表1), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。所扩增片段均在ALS基因的外显子区, 不包含内含子, 所扩增的2个片段可覆盖已报道的8个ALS抗性突变位点。

表1 稗ALS基因片段扩增所用引物

Table 1 Primers used for ALS gene amplification in *Echinochloa crus-galli*

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃	片段大小 Product size/bp	包含的突变位点 Mutation sites contained
Ecl-F1	CCCCACCGAGCCGCGCAAG	65.5	849	122/197/205
Ecl-R1	TCGAACCGCACACCAAATGCC			
Ecl-F2	TGACCGGAATCCCAGTGACA	63.0	1 051	376/377/574/653/654
Ecl-R2	CCGGATAAATACACGGTCCTGC			

50 μL PCR 扩增体系: ddH₂O 17.5 μL、2×Taq PCR Mixture 25 μL、正反向引物各2.5 μL、DNA模板

2.5 μL。PCR 反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 65.5℃或63.0℃退火30 s, 72℃延伸1 min,

共35个循环;最后72℃终延伸7 min。取扩增产物5 μL于1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳检测,将含目的条带的PCR扩增产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。稗抗性、敏感种群均选取10个样品。将测序所得核苷酸序列文本进行拼接并用DNAMAN软件翻译成氨基酸序列后,首先将核苷酸序列和氨基酸序列在NCBI数据库进行BLAST比对,以确定所得序列是否为目标序列;然后结合测序峰图,用Chromas 2.33软件分析抗性稗ALS基因的Ala-122、Pro-197、Ala-205、Asp-376、Gly-377、Trp-574、Ser-653、Gly-654氨基酸位点(Beckie & Tardif, 2012; Yu & Powles, 2014a)处是否发生了碱基置换、移位、缺失和插入等非同义突变情况。

1.2.3 P450、GST抑制剂对五氟磺草胺抗性水平的影响

P450、GST介导的代谢抗性在多种杂草中已有报道,为明确本研究中稗抗性种群对五氟磺草胺的抗性是否与此有关,以1.2.2中所用抗性种群和最敏感种群进行试验,试材培养、抗性种群和敏感种群五氟磺草胺浓度梯度设置、药剂喷施方法均同1.2.1。将PBO和NBD-Cl分别用丙酮进行溶解,然后用0.1%吐温-80水溶液配成母液,PBO和NBD-Cl处理剂量分别为4 200 g/hm²和270 g/hm²(Cummins et al., 2013; Guo et al., 2016)。喷施抑制剂观察1 h后,按照1.2.1方法和剂量喷施五氟磺草胺,以只喷施相应抑制剂的处理为抑制剂对照,以只喷施药剂的处理为药剂对照。处理后21 d按照1.2.1方法计算相对

干重、干重抑制中量GR₅₀和抗性倍数。

1.2.4 抗性、敏感种群对其它除草剂的敏感性测定

选取抗性种群和敏感种群各1个,按照1.2.1方法培养幼苗,3~4叶期时喷施不同除草剂,每种除草剂均以推荐剂量下限作为处理剂量,双草醚剂量为30 g/hm²,二氯喹啉酸剂量为375 g/hm²,氰氟草酯剂量为90 g/hm²,噁唑酰草胺剂量为90 g/hm²。处理后21 d检查各处理稗死亡数及地上部分干重,计算死亡率和干重抑制率,死亡(干重抑制)率=[1-处理组存活数(干重)/对照组存活数(干重)]×100%。

1.3 数据分析

分别使用Excel 2016和SPSS 21.0软件进行数据统计及单因素方差分析,采用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同稗种群对五氟磺草胺的抗性水平

本试验所采集的广东省多数稻田稗种群对五氟磺草胺仍较为敏感,在推荐剂量30 g/hm²处理下均死亡,仅采自湛江市的BC-7种群可以存活,初步判断该种群可能已产生抗性。经不同浓度梯度五氟磺草胺处理后,BC-1~BC-6、BC-8和BC-9这7个种群的GR₅₀为4.8~6.3 g/hm²(表2),均属于敏感种群;而BC-7种群的GR₅₀值为31.1 g/hm²,是BC-2种群(GR₅₀值4.8 g/hm²)的6.5倍,说明BC-7种群对五氟磺草胺产生了明显的抗性。

表2 广东省不同稗种群对五氟磺草胺的抗性水平

Table 2 Penoxsulam resistance levels of different *Echinochloa crus-galli* populations from Guangdong Province

种群 Population	敏感性 Susceptibility	回归方程参数 Regression parameter			GR ₅₀ / (g/hm ²)	抗性倍数 Resistance index
		C	D	b		
BC-1	敏感 Susceptible	11.7±0.9	93.8±0.9	-1.5±0.1	5.6±0.2	1.2
BC-2	敏感 Susceptible	10.2±3.4	90.3±3.8	-1.5±0.3	4.8±0.6	1.0
BC-3	敏感 Susceptible	11.5±2.4	95.8±2.5	-1.8±0.2	5.5±0.5	1.1
BC-4	敏感 Susceptible	13.9±2.6	92.1±2.7	-1.8±0.3	5.4±0.5	1.1
BC-5	敏感 Susceptible	10.2±1.8	83.8±1.7	-2.0±0.2	5.9±0.4	1.2
BC-6	敏感 Susceptible	10.6±1.5	89.1±1.4	-1.7±0.1	6.3±0.3	1.3
BC-7	抗性 Resistant	4.5±4.3	97.9±2.7	-1.7±0.3	31.1±3.2	6.5
BC-8	敏感 Susceptible	7.7±1.3	93.9±1.3	-1.4±0.1	5.7±0.3	1.2
BC-9	敏感 Susceptible	11.6±0.8	90.7±0.8	-1.7±0.1	6.2±0.2	1.3

C、D: 剂量反应下限、上限; b为干重抑制率50%时对应的五氟磺草胺剂量处的斜率; GR₅₀: 干重抑制中量。C and D: The lower and upper asymptotic limits; b: the slope around the penoxsulam dose resulting in 50% growth inhibition; GR₅₀: the herbicide dose required to cause 50% growth reduction of dry weight..

2.2 稗ALS基因片段序列测序

利用引物对Ecl-F1/Ecl-R1和Ecl-F2/Ecl-R2从抗性种群BC-7和敏感种群BC-2中均成功扩增到目

的片段,将测序所得序列进行拼接,得到清晰无杂峰的长度为1 638 bp的序列片段,共编码546个氨基酸。BLAST对比结果表明,所得的核苷酸序列和氨

基酸序列与已公开的稗 *ALS* 基因核苷酸序列 (KY071206.1) 和氨基酸序列 (AT196870.1) 同源性分别达 99.2% 和 100.0%, 说明本研究所得序列为稗的 *ALS* 基因序列。对比抗性种群 BC-7 和敏感种群 BC-2 的 *ALS* 基因序列片段发现, 两者在已报道的 8 个突变位点处序列无差异, 说明抗性种群 BC-7 并未发生相关突变 (图 1), *ALS* 基因突变不是导致其对五氟磺草胺产生抗性的原因。

2.3 P450、GST 抑制剂对五氟磺草胺抗性水平的影响

使用 P450 抑制剂 PBO 和 GST 抑制剂 NBD-Cl 对稗进行处理后, 2 种抑制剂本身对稗均无明显影

响。当用 2 种抑制剂预处理稗种群后再施药, 敏感种群 BC-2 对五氟磺草胺的敏感性无明显变化, 但 PBO 和 NBD-Cl 均可提高抗性种群 BC-7 对五氟磺草胺的敏感性, 即与药剂对照相比, 使用 PBO 或 NBD-Cl 预处理的稗种群在相同五氟磺草胺剂量处理下的相对干重有不同程度下降 (图 2)。在 PBO 和 NBD-Cl 预处理稗种群后, 抗性种群 BC-7 的 GR_{50} 值由 31.1 g/hm² 分别降低至 11.0 g/hm² 和 24.7 g/hm², 对五氟磺草胺的抗性倍数分别降至 2.3 倍和 4.8 倍 (表 3)。因此, 抗性种群 BC-7 很可能存在 P450 和 GST 介导的代谢抗性。

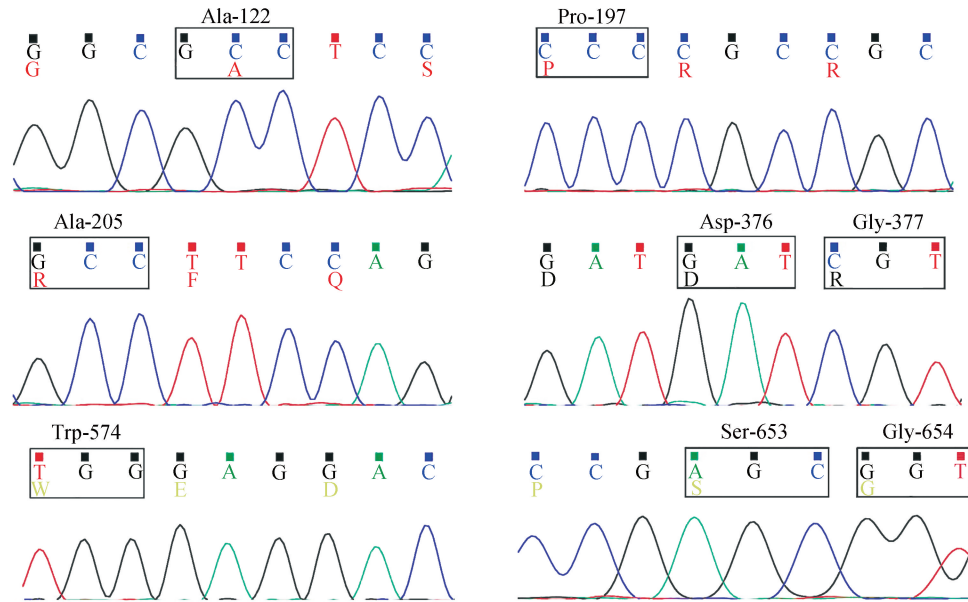
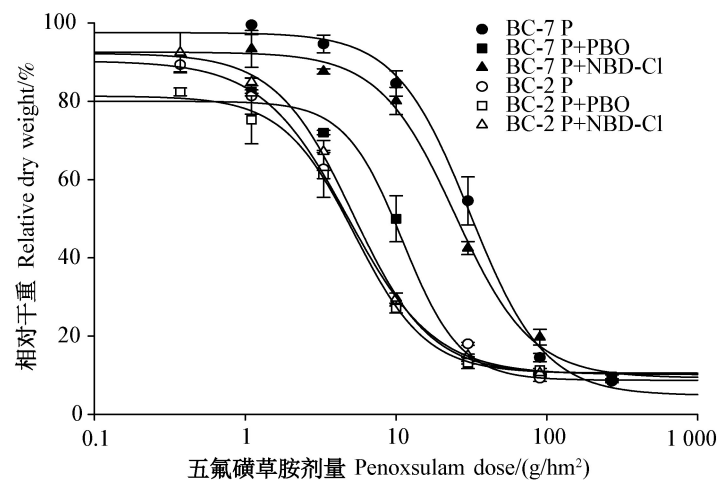


图 1 稗抗性种群 BC-7 的 *ALS* 基因在 8 个已知抗性位点处的测序峰图

Fig. 1 Sequence chromatograms at eight mutation sites of *ALS* gene in BC-7 resistance population of *Echinochloa crus-galli*



P: 五氟磺草胺; PBO: 胡椒基丁醚; NBD-Cl: 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑。

P: Penoxsulam; PBO: piperonylbutoxide; NBD-Cl: 4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole.

图 2 稗敏感种群 BC-2 和抗性种群 BC-7 在 PBO、NBD-Cl 预处理下对五氟磺草胺剂量的反应曲线

Fig. 2 Penoxsulam dose-response curves under PBO or NBD-Cl pretreatment in BC-2 susceptible population and BC-7 resistant population of *Echinochloa crus-galli*

2.4 抗性、敏感种群对其它除草剂的敏感性

敏感种群 BC-2 和抗性种群 BC-7 在氰氟草酯和噁唑酰草胺推荐剂量处理下死亡率均达 100.0%, 干重抑制率在 92.2% 以上, 说明氰氟草酯和噁唑酰草胺可用于防除已对五氟磺草胺产生抗性的 BC-7 种群; 在二氯喹啉酸推荐剂量处理下, 敏感种群 BC-2 彻底死亡, 但抗性种群 BC-7 未见死亡, 且干重抑制

率仅为 5.0%, 说明抗性种群 BC-7 不仅对五氟磺草胺产生了抗性, 对二氯喹啉酸也产生了明显抗性; 在双草醚推荐剂量处理下, 抗性种群 BC-7 的死亡率和干重抑制率分别仅为 44.4% 和 46.3%, 远低于敏感种群 BC-2 (表 4), 表明双草醚不适用于防除抗性种群 BC-7, 这可能与双草醚与五氟磺草胺同属 ALS 类除草剂, 抗性种群 BC-7 对双草醚产生了交互抗性有关。

表 3 稗敏感种群 BC-2 和抗性种群 BC-7 在 PBO、NBD-Cl 预处理下对五氟磺草胺的 GR_{50} 值

Table 3 GR_{50} values to penoxsulam under PBO or NBD-Cl pretreatment in BC-2 susceptible population and BC-7 resistant population of *Echinochloa crus-galli*

种群 Population	五氟磺草胺 Penoxsulam		五氟磺草胺+PBO Penoxsulam+PBO		五氟磺草胺+NBD-Cl Penoxsulam+NBD-Cl	
	$GR_{50}/$ (g/hm ²)	抗性倍数 Resistance index	$GR_{50}/$ (g/hm ²)	抗性倍数 Resistance index	$GR_{50}/$ (g/hm ²)	抗性倍数 Resistance index
BC-2	4.8±0.6 a	1.0	4.7±0.4 a	1.0	5.1±0.3 a	1.0
BC-7	31.1±3.3 a	6.5	11.0±1.3 c	2.3	24.7±2.7 b	4.8

PBO: 胡椒基丁醚; NBD-Cl: 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑; GR_{50} : 干重抑制中量。表中数据为平均数±标准误。同行不同字母表示 GR_{50} 值经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。PBO: Piperonylbutoxide; NBD-Cl: 4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole; GR_{50} : the herbicide dose required to cause 50% growth reduction of dry weight. Data are mean±SE. Different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

表 4 稗敏感种群 BC-2 和抗性种群 BC-7 对其它除草剂的敏感性

Table 4 Sensitivities to other herbicides in BC-2 susceptible population and BC-7 resistant population of *Echinochloa crus-galli*

除草剂 Herbicide	剂量 Herbicide dose/(g/hm ²)	种群 Population	死亡率 Mortality rate/%	干重抑制率 Inhibition of dry weight/%
噁唑酰草胺 Metamifop	90	BC-2	100.0±0.0 a	92.2±0.6 a
氰氟草酯 Cyhalofop-butyl		BC-7	100.0±0.0 a	93.7±0.5 a
二氯喹啉酸 Quinclorac	375	BC-2	100.0±0.0 a	93.0±0.4 a
双草醚 Bispyribac-sodium		BC-7	100.0±0.0 a	92.6±0.8 a
	30	BC-2	100.0±0.0 a	90.9±0.6 a
		BC-7	0.0±0.0 c	5.0±2.5 c
	30	BC-2	100.0±0.0 a	91.0±0.8 a
		BC-7	44.4±7.8 b	46.3±3.5 b

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

本研究结果显示, 稗 BC-7 种群对五氟磺草胺产生了抗性, 这是五氟磺草胺抗性杂草在华南地区首次被报道。相对于其它作用靶标的除草剂, ALS 类除草剂较容易导致杂草产生抗性, 使用不到 10 次即可导致抗性种群的出现 (Beckie, 2006)。五氟磺草胺于 2009 年进入中国市场 (顾林玲, 2015), 但研究者发现采自 2012—2013 年的稻田稗种群已对五氟磺草胺产生了不同水平的抗性 (Chen et al., 2016), 表明五氟磺草胺防除稗具有较高的抗性风险。本研究所测定的广东省 9 个不同地区稗种群中, 只有 1 个种群产生了明显抗性, 且其附近田块的种群 BC-5、

BC-6 并未产生抗性, 说明广东省稻田稗对五氟磺草胺的抗性可能仍处于早期发展阶段, 连续使用数年后, 抗性稗种群在广东省很可能进一步蔓延。除抗性种群扩展外, 抗性水平也应值得关注, 如我国黑龙江、安徽、江苏等省水稻田稗种群对五氟磺草胺抗性倍数达 33~252 倍 (Chen et al., 2016; 王晓琳等, 2017; Fang et al., 2019a), 均显著高于本研究中的抗性种群 BC-7 的抗性倍数 6.5 倍, 若继续使用该类除草剂, 其抗性水平有进一步提高的风险。

ALS 基因突变是报道最多的杂草对 ALS 类除草剂产生抗性的机制 (Yu & Powles, 2014a), 但本研究抗性种群 BC-7 并未在已知抗性位点处发生突变, 在其它氨基酸位点处与敏感种群也无差异。而非靶

标抗性机制也是杂草对除草剂产生抗性的重要途径 (Délye et al., 2013), 如房加鹏等 (2018) 发现稗 HYYJ-1 种群对五氟磺草胺抗性与 *ALS* 基因突变无关, 而与 P450 代谢增强有关。采自澳大利亚的 6 个硬雀麦 *Bromus rigidus* 种群对 *ALS* 类除草剂的抗性是由 P450 活性增强所致 (Owen et al., 2012)。不同于靶标基因单个氨基酸突变即可导致杂草产生明显的抗性, 非靶标抗性大多由多基因控制, 通常是多个基因家族不断累积、联合作用的结果 (Yuan et al., 2007; Délye et al., 2013), 因此非靶标抗性较为复杂, 在抗性早期难以明确。随着基因组学技术的发展, 越来越多的非靶标抗性相关基因被发现, 如在稗基因组中分别鉴定到 917 个 P450 基因和 227 个 GST 基因, 显著高于水稻、玉米等其它植物, 因此稗对除草剂或周围其它植物释放的化感化合物具有较强的代谢解毒能力 (Guo et al., 2017)。在五氟磺草胺抗性稗中, 研究者发现 30 多个基因表达上调, 涉及 P450、GST、过氧化物酶等多个代谢解毒酶系 (Fang et al., 2019b)。本研究发现 PBO 和 NBD-Cl 均可增强抗性种群 BC-7 对五氟磺草胺的敏感性, 说明 P450 或 GST 等酶系很可能参与了 BC-7 种群对五氟磺草胺的抗性, 具体的抗性基因需要进一步明确。

本研究中, BC-7 种群不仅对五氟磺草胺产生了抗性, 对二氯喹啉酸也产生了明显抗性。由于二氯喹啉酸在广东省使用年限较久 (张宏军等, 2017), 该种群很可能首先对二氯喹啉酸产生了抗性, 轮换使用五氟磺草胺后逐渐对两者产生了多抗性。杂草对某种除草剂产生抗性后, 其抗性基因在停止使用该除草剂后可继续保留下来, 导致产生多抗性种群, 在硬直黑麦草、看麦娘 *Alopecurus aequalis* 等多种杂草中均发现此类现象 (Collavo et al., 2013; Guo et al., 2018)。因此, 在杂草防治过程中, 应采取综合防治措施, 减少对化学除草剂的依赖, 尽量避免连续使用同一类别的除草剂, 以延缓抗药性的产生 (程家安和祝增荣, 2017)。在治理抗性杂草时, 应避免简单轮换另一类别的除草剂, 防止多抗性种群的产生, 以免最终面临无药可用的困境。氰氟草酯和噁唑酰草胺均为乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl coenzyme A carboxylase, ACCase) 类除草剂, 该类除草剂也具有极高的抗性风险 (Beckie, 2006), 我国辽宁、黑龙江等省水稻田稗种群已对噁唑酰草胺产生了 30 倍以上的抗性 (左平春等, 2017)。因此, 虽然抗性种群 BC-7 对氰氟草酯和噁唑酰草胺仍较为敏感, 但应尽量采用多元化的抗性治理措施, 延长现有除草剂的使用周

期, 保障农田杂草的可持续治理。

参 考 文 献 (References)

- BECKIE HJ. 2006. Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technology*, 20(3): 793–814
- BECKIE HJ, TARDIF FJ. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35: 15–28
- 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 ACCase 基因突变. *植物保护学报*, 42(3): 447–452]
- CHEN GQ, TANG W, LI J, LU YL, DONG LY. 2019. Distribution characteristics of *Echinochloa* species in rice fields in China: a case survey on 73 sites from nine provincial administrative regions. *Chinese Journal of Rice Science*, 33(4): 368–376 (in Chinese) [陈国奇, 唐伟, 李俊, 陆永良, 董立尧. 2019. 我国水稻田稗属杂草种类分布特点: 以 9 个省级行政区 73 个样点调查数据为例. *中国水稻科学*, 33(4): 368–376]
- CHEN GQ, WANG Q, YAO ZW, ZHU LF, DONG LY. 2016. Penoxsulam-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice fields in China. *Weed Biology and Management*, 16(1): 16–23
- CHENG JA, ZHU ZR. 2017. Development of rice pest management in the past 60 years in China: problems and strategies. *Journal of Plant Protection*, 44(6): 885–895 (in Chinese) [程家安, 祝增荣. 2017. 中国水稻病虫害治理 60 年: 问题与对策. *植物保护学报*, 44(6): 885–895]
- COLLAVO A, STREK H, BEFFA R, SATTIN M. 2013. Management of an ACCase-inhibitor-resistant *Lolium rigidum* population based on the use of ALS inhibitors: weed population evolution observed over a 7 year field-scale investigation. *Pest Management Science*, 69(2): 200–208
- CUMMINS I, WORTLEY DJ, SABBADIN F, HE ZS, COXON CR, STRAKER HE, SELLARS JD, KNIGHT K, EDWARDS L, HUGHES D, et al. 2013. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15): 5812–5817
- DÉLYE C, JASIENIUK M, LE CORRE V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11): 649–658
- DOYLE JJ, DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13–15
- FANG JP, LIU TT, ZHANG YH, LI J, DONG LY. 2019a. Target site-based penoxsulam resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) from China. *Weed Science*, 67(3): 281–287
- FANG JP, ZHANG L, LI R, CHEN GQ, DONG LY. 2018. P450-mediated metabolism, related to the penoxsulam resistance in barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 41(5): 854–859 (in Chinese) [房加鹏, 张琳, 李茹, 陈国奇, 董立尧. 2018. 稗 HYYJ-1 种群对五氟磺草胺的抗

- 药性及其与细胞色素 P450 代谢的关系. 南京农业大学学报, 41(5): 854–859]
- FANG JP, ZHANG YH, LIU TT, YAN BJ, LI J, DONG LY. 2019b. Target-site and metabolic resistance mechanisms to penoxsulam in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(29): 8085–8095
- GUO LL. 2015. Penoxsulam, a triazolopyrimidine sulfonamide herbicide. Modern Agrochemicals, 14(2): 46–51 (in Chinese) [顾林玲. 2015. 三唑并嘧啶磺酰胺类除草剂: 五氟磺草胺. 现代农药, 14(2): 46–51]
- GUO LB, QIU J, YE CY, JIN GL, MAO LF, ZHANG HQ, YANG XF, PENG Q, WANG YY, JIA L, et al. 2017. *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. Nature Communications, 8: 1031
- GUO WL, CHI YY, FENG L, TIAN XS, LIU WT, WANG JX. 2018. Fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl resistance status of shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) in eastern China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 148: 126–132
- GUO WL, LV LL, ZHANG LL, LI Q, WU CX, LU XT, LIU WT, WANG JX. 2016. Herbicides cross resistance of a multiple resistant short-awn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) population in wheat field. Chilean Journal of Agricultural Research, 76(2): 163–169
- GUO WL, WU DD, ZHANG C, FENG L, TIAN XS. 2019. Herbicidal activity and field control effects of five herbicides to grass weeds infesting direct seeding rice. Journal of Southern Agriculture, 50(6): 1240–1246 (in Chinese) [郭文磊, 吴丹丹, 张纯, 冯莉, 田兴山. 2019. 5 种茎叶处理除草剂对直播稻田禾本科杂草的除草活性及田间防效. 南方农业学报, 50(6): 1240–1246]
- HEAP I. 2019. International survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.com>. 2019-10-30
- HUANG BQ, LIN SX, XIAO ZY. 1995. The present situation of resistance of the barnyardgrass to butachlor in the rice planting areas in China. Journal of Plant Protection, 22(3): 281–286 (in Chinese) [黄炳球, 林韶湘, 肖整玉. 1995. 我国稻田稗草对丁草胺抗药性现状. 植物保护学报, 22(3): 281–286]
- KALOUMENOS NS, CHATZILAZARIDOU SL, MYLONA PV, POLIDOROS AN, ELEFTHEROHORINOS IG. 2013. Target-site mutation associated with cross resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.). Pest Management Science, 69(7): 865–873
- OERKE EC, DEHNE HW. 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. Crop Protection, 23(4): 275–285
- OWEN MJ, GOGGIN DE, POWLES SB. 2012. Non-target-site-based resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from western Australian cropping fields. Pest Management Science, 68(7): 1077–1082
- POWLES SB, YU Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology, 61: 317–347
- PRESTON C, TARDIF FJ, CHRISTOPHER JT, POWLES SB. 1996. Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. Pesticide Biochemistry and Physiology, 54(2): 123–134
- 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 and Food Chemistry, 61(2): 278–289
- WANG XL, NIU LC, JIANG YC, ZHANG ZY, LI G. 2017. The sensitivity of different *Echinochloa crus-galli* 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]
- YANG CH, FENG L, YANG HM, YUE MF, TIAN XS. 2011. Identification of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) resistant to butachlor and quinclorac in rice fields. Agrochemicals, 50(8): 606–607, 610 (in Chinese) [杨彩宏, 冯莉, 杨红梅, 岳茂峰, 田兴山. 2011. 稻田稗草对丁草胺和二氯喹啉酸抗药性的测定. 农药, 50(8): 606–607, 610]
- YU Q, POWLES SB. 2014a. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. Pest Management Science, 70(9): 1340–1350
- YU Q, POWLES SB. 2014b. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. Plant Physiology, 166(3): 1106–1118
- YUAN JS, TRANEL PJ, STEWART CN Jr. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. Trends in Plant Science, 12(1): 6–13
- ZHANG HJ, ZHOU PG, ZHAO DT, LI XB. 2017. Investigation on weed infestation and herbicide application in rice in Zhejiang and Guangdong provinces. Pesticide Science and Administration, 38(2): 11–16 (in Chinese) [张宏军, 周普国, 赵东涛, 李贤宾. 2017. 浙江和广东稻田杂草发生及除草剂应用情况分析. 农药科学与管理, 38(2): 11–16]
- ZHANG ZC, LI YF, ZHANG B, YANG X. 2014. Influence of weeds in *Echinochloa* on growth and yield of rice. Chinese Journal of Applied Ecology, 25(11): 3177–3184 (in Chinese) [张自常, 李永丰, 张彬, 杨霞. 2014. 稗属杂草对水稻生长发育和产量的影响. 应用生态学报, 25(11): 3177–3184]
- ZHU WD. 2005. Influence of barnyardgrass, *Echinochloa crus-galli*, on the growth and yield of paddy rice and its economic threshold. Journal of Plant Protection, 32(1): 81–86 (in Chinese) [朱文达. 2005. 稗对水稻生长和产量性状的影响及其经济阈值. 植物保护学报, 32(1): 81–86]
- ZUO PC, JI MS, ZANG XX, CHEN SH, DU Y. 2017. The resistance level and acetyl co-enzyme A carboxylase activity of *Echinochloa phyllopogon* populations to metamifop in paddies. Journal of Plant Protection, 44(6): 1040–1045 (in Chinese) [左平春, 纪明山, 臧晓霞, 陈仕红, 杜颖. 2017. 稻田稗草对噁唑酰草胺的抗药性水平和 ACCase 活性. 植物保护学报, 44(6): 1040–1045]

(责任编辑:李美娟)