

小麦田麦家公对苯磺隆的抗性机理

王恒智¹ 白霜¹ 吴小虎² 吴翠霞³ 刘伟堂^{1*} 王金信^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;

3. 泰安农业科学研究院, 山东 泰安 271000)

摘要: 为明确麦田阔叶杂草麦家公 *Lithospermum arvense* L. 对苯磺隆的抗性机理, 以苯磺隆抗性和敏感型麦家公为材料, 比较分析这2个生物型麦家公靶标酶乙酰乳酸合成酶 (acetolactate synthase, ALS)、解毒酶谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 以及保护酶过氧化物酶 (peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 对苯磺隆的响应差异性。结果表明, 抗性麦家公 ALS 对苯磺隆的敏感性较敏感型麦家公显著下降, 苯磺隆的抑制中浓度分别为 0.187、0.036 $\mu\text{mol/L}$ 。苯磺隆胁迫后, 抗性和敏感型麦家公 ALS 活性都出现下降, 但抗性麦家公 ALS 活性可恢复, 而敏感型麦家公 ALS 活性则不能恢复; 2个生物型麦家公 GST 活性都能被苯磺隆诱导, 但抗性麦家公 GST 累计活性为 29.31 U, 高于敏感型麦家公 (25.90 U); 抗性麦家公 SOD 累计活性为 24.49 U, 较敏感型麦家公 (19.31 U) 高, 且具有较强的恢复能力; 抗性麦家公 POD 和 CAT 累计活性分别为 126.92~550.68 U 和 41.41~77.19 U, 也高于敏感型麦家公的 93.75~271.04 U、42.17~57.28 U。因此, 靶标酶 ALS 对苯磺隆敏感性减弱是麦家公产生抗性的一个重要原因, 解毒酶 GST、SOD、POD 和 CAT 活性升高可能与抗性有关。

关键词: 麦家公; 乙酰乳酸合成酶; 除草剂; 苯磺隆; 抗药性

Resistance mechanism of *Lithospermum arvense* L. to tribenuron-methyl in winter wheat field

Wang Hengzhi¹ Bai Shuang¹ Wu Xiaohu² Wu Cuixia³ Liu Weitang^{1*} Wang Jinxin^{1*}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China;

2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Tai'an Academy of Agricultural Sciences, Tai'an 271000, Shandong Province, China)

Abstract: To clarify the tribenuron-methyl-resistance mechanism in the broad-leaf weed *Lithospermum arvense* L. in wheat fields, the difference in the response of the target enzymes acetolactate synthase (ALS), metabolic enzyme glutathione-S-transferase (GST) and protective enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) to herbicides was analyzed by using tribenuron-methyl susceptible and resistant plants. The results showed that the *in vitro* ALS sensitivity to tribenuron-methyl was significantly reduced in resistant plants when compared with susceptible plants, and the IC_{50} values of tribenuron-methyl for ALS were 0.187 and 0.036 $\mu\text{mol/L}$ for susceptible and resistant plants, respectively. *In vivo* experiments revealed that the ALS activity of resistant biotype could be recovered after temporarily inhibited by tribenuron-methyl treatment. However, the *in vivo* ALS activity of susceptible biotype was consistently reduced after tribenuron-methyl treatment. The GST activity could be induced by tribenuron-methyl treatment in all biotypes, while the resistant biotype had a great-

基金项目: 国家自然科学基金(31601653), 中国博士后科学基金(2017M612311), 山东省“双一流”建设专项(SYL2017XTTD11)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: liuwt@sdaa.edu.cn, wangjx@sdaa.edu.cn

收稿日期: 2017-10-06

er accumulative activity (29.31 U) than the susceptible biotype (25.90 U). In addition, resistant plants had a higher SOD accumulative activity (24.49 U) and stronger recovery ability of SOD than that in sensitive plants (19.31 U); the resistant plants also hold higher POD activity (126.92–550.68 U), CAT activity (41.41–77.19 U) than those in susceptible plants (93.75–271.04 U, 42.17–57.28 U). Based on these findings, reduced ALS sensitivity to tribenuron-methyl was partly responsible for the tribenuron-methyl-resistance in *L. arvense* L., and the enhanced GST, SOD, POD, CAT activities might also contribute to the tribenuron-methyl resistance.

Key words: *Lithospermum arvense* L.; acetolactate synthase (ALS); herbicide; tribenuron-methyl; resistance

乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS)是重要的除草剂作用位点, ALS类除草剂通过抑制ALS酶的活性从而干扰植物生命活动中所必需的支链氨基酸——异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的生物合成,并致使植物逐步死亡(Ray, 1984; McCourt et al., 2006; Duggleby et al., 2008)。该类除草剂有磺酰脲类(Chaleff & Mauvais, 1984)、磺酰胺羧基三唑啉酮类(Santel et al., 1999)、三唑并嘧啶类(Gerwick et al., 1990)、咪唑啉酮类(Shaner et al., 1984)和嘧啶硫代苯甲酸酯类五大类(Stidham, 1991)。ALS类除草剂具有环境友好、作物选择性强、活性高、杀草谱广、对哺乳动物安全等优点(Tranel & Wright, 2002),因此在农田中广泛使用,但该类药剂属于高风险除草剂,连续单一重复使用容易使杂草产生抗性(张朝贤等, 2009; Yu & Powles, 2014a)。截止到2018年12月,全球已报道抗ALS类除草剂的杂草有160种,我国农田现有15种杂草对ALS类除草剂已产生抗性(Heap, 2018)。苯磺隆是广泛用于防治小麦田阔叶杂草的一个ALS类除草剂品种,但由于连续单一使用,我国多个小麦主产区杂草如播娘蒿 *Descurainia sophia* (Cui et al., 2011; Han et al., 2012; Deng et al., 2015)、荠菜 *Capsella bursa-pastoris* (Cui et al., 2012; Zhang et al., 2017)、猪殃殃 *Galium aparine* (彭学岗等, 2008; 崔海兰等, 2016)、牛繁缕 *Myosoton aquaticum* L. (Liu et al., 2015a)和麦家公 *Lithospermum arvense* L. (吴小虎等, 2011)等对其已产生不同程度的抗性。麦家公属于紫草科紫草属,在我国华北地区以及淮河流域的部分区域麦田危害较严重。吴小虎等(2011)研究结果表明山东省部分地区麦田中的麦家公对苯磺隆已产生抗性,其中胶州市采集点的麦家公抗性倍数达12.8,其对ALS抑制剂噻吩磺隆和苄嘧磺隆也产生不同程度的交互抗性,且ALS对苯磺隆的敏感性较敏感生物型略有降低,但这并不能完整阐明其对苯磺隆产生抗性的原因。此

外,关于麦家公对苯磺隆代谢抗性机理的研究也未见相关报道。

国内外研究一致认为靶标抗性机理和非靶标抗性机理是杂草对ALS类除草剂产生抗性的两大原因(Powles & Yu, 2010; Yu & Powles, 2014a, b)。靶标基因突变引起靶标酶对药剂敏感性改变以及靶标酶超表达是目前已知的靶标抗性机制。Tranel et al. (2018)和Yu & Powles(2014a)研究证实ALS存在8个抗性突变位点,分别是第122位丙氨酸、第197位脯氨酸、第205位丙氨酸、第376位天冬氨酸、第377位精氨酸、第574位色氨酸、第653位丝氨酸和第654位甘氨酸(氨基酸位置以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的ALS序列为标准),已报到的抗性突变超过26种,并且杂草的ALS突变具有多样性。非靶标抗性机理更复杂,可通过多种机制降低除草剂到达作用靶标的有效剂量,杂草对ALS类除草剂代谢作用增强,也称代谢抗性,是一种重要的非靶标机理;细胞色素P450单加氧酶活性、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)的联合解毒作用导致杂草对除草剂产生抗性的现象已在多种抗性杂草中得到证实(Yu & Powles, 2014a, b)。代谢抗性是最新发现的一种数量性状,其受多基因调控(Délye, 2013; Délye et al., 2013);国内外学者借助转录组测序等分子生物学方法筛选鉴定到多个潜在代谢抗性基因,极大地推动了非靶标抗性机理的深入解析(Pan et al., 2016; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2017)。

本研究以对苯磺隆抗性和敏感麦家公为材料,比较这2种生物型ALS、GST以及保护酶——过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)对苯磺隆的响应差异性,明确麦家公对苯磺隆的抗性机理,以期为进一步探究麦家公抗性鉴定监测以及抗性治理奠定基础,为其它杂草抗性机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:抗性和敏感型麦家公种子分别自山东省青岛胶州市胶州农场麦田以及无除草剂使用历史的非耕地采集。

试剂及药剂:98%苯磺隆(tribenuron-methyl)原药,江苏龙灯化学有限公司;丙酮酸钠、还原型谷胱甘肽、聚乙烯吡咯烷酮,北京索莱宝科技有限公司;硫胺素焦磷酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;黄素腺嘌呤二核苷酸,美国Sigma公司;其它试剂均为国产分析纯。

仪器:ASS-4智能喷雾机,国家农业信息化工程技术研究中心;CR22GII型高速冷冻离心机,日本日立公司;UV-2201紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 ALS提取制备及离体活性的测定

ALS提取参照Ray(1984)和毕亚玲等(2013)方法。ALS离体活性测定参照范志金等(2003)和毕亚玲等(2013)方法。用丙酮将苯磺隆原药溶解,用0.1%吐温-80水溶液乳化稀释获得母液,经梯度稀释获得浓度为 7.5×10^{-4} 、 7.5×10^{-3} 、 7.575×10^{-2} 、0.75、7.5、37.5 $\mu\text{mol/L}$ 的药剂溶液,每个浓度设3次重复,ALS活性以单位时间内生成单位纳摩尔乙偶姻表示,即 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$,以0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)替代苯磺隆药液所测定的ALS活性记为ALS总催化活性。采用考马斯亮蓝G-250法测定蛋白含量(Bradford, 1976)。利用SigmaPlot 12.5软件的非线性模型(Seefeldt et al., 1995)拟合ALS活性抑制中浓度 IC_{50} , $y = C + (D - C) / (1 + x / \text{IC}_{50})^b$,其中 y 为各处理下酶活性抑制率; C 为药剂剂量反应下限; D 为药剂剂量反应上限; x 为药剂浓度; IC_{50} 为酶活性抑制中浓度; b 为斜率。抗性水平=抗性麦家公 IC_{50} /敏感型麦家公 IC_{50} 。

1.2.2 苯磺隆喷雾试验及ALS活体活性的测定

将苯磺隆原药使用丙酮进行溶解后经0.1%吐温-80水溶液乳化梯度稀释,备用。选取大小均匀一致的抗性和敏感型麦家公种子,0.5%赤霉素溶液处理24 h,在生化培养箱中全天黑暗催芽72 h,全天10 h温度设置为16℃,14 h温度设置为22℃。取萌发种子约20粒播入直径12 cm、高度10 cm的圆形塑料盆中,出苗后间苗至每盆8株,当麦家公长至3~4叶期时,使用ASS-4智能喷雾机分别对抗性和敏感型麦家公茎叶进行苯磺隆喷雾处理,使用Teejet

9503EVS扇形喷头,喷液量为450 L/hm²,压力为275 kPa,剂量为11.25 g(a.i)/hm²,同时以0.1%吐温-80水溶液作为对照处理。

药后7 d内连续每天采集处理组、空白对照组麦家公植株地上部茎叶组织2 g,于-20℃保存备用。ALS提取参照Ray(1984)和毕亚玲等(2013)方法,ALS活性测定同1.2.1,ALS活体活性是测定苯磺隆茎叶喷雾处理后植株体内ALS活性随时间的动态变化,在测定时,用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)替代1.2.1中不同浓度的苯磺隆溶液。

1.2.3 GST活性的测定

麦家公处理、取样和保存同1.2.2。参照吴进才等(2003)和毕亚玲等(2013)方法进行GST提取及活性测定。GST活性以10 min内1 L内1 mg蛋白催化反应使反应体系溶液的吸光度OD_{340 nm}变0.001为1个酶活性单位,即1 U,以1 mg/L可溶性蛋白的酶活性单位数为GST活性。

1.2.4 POD、SOD、CAT活性的测定

麦家公处理、取样和保存同1.2.2。参照Kwak et al.(1995)和李合生(2000)方法测定POD活性,以1 min内反应体系溶液的吸光度A_{470 nm}变化0.001为1个POD酶活性单位,即1 U。参照赵世杰等(2002)方法测定SOD和CAT活性,以1 min内每克植物组织(杂草鲜重)抑制氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)光还原50%作为1个SOD活性单位,即1 U;以1 min内反应体系溶液的吸光度A_{240 nm}减少0.1为1个CAT活性单位,即1 U。

1.3 数据分析

使用SPSS 17.0软件进行试验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 苯磺隆对麦家公ALS离体活性的影响

抗性和敏感型麦家公2个生物型的ALS总活性基本相同,分别为38.92 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$ 和35.00 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$,且二者之间差异不显著;苯磺隆对抗性和敏感型麦家公ALS的抑制中浓度分别为0.187、0.036 $\mu\text{mol/L}$;抗性麦家公对苯磺隆的抗性指数为5.17(表1)。随着苯磺隆浓度的增加,其对2个生物型ALS活性的抑制作用均增大,但苯磺隆对抗性麦家公ALS的抑制作用比敏感型麦家公的弱,随着苯磺隆浓度的增加,其对2个生物型ALS抑制作用差异越明显(图1)。

表 1 离体条件下抗性和敏感型麦家公 ALS 对苯磺隆的敏感性

Table 1 Sensitivities of <i>in vitro</i> ALS extracted from resistant and sensitive <i>Lithospermum arvense</i> L. to tribenuron-methyl					
生物型 Biotype	ALS 总活性 Total ALS activity (nmol·mg ⁻¹ protein·min ⁻¹)	抑制中浓度 IC ₅₀ (μmol/L)	拟合方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	抗性指数 Resistance index
抗性 Resistant	38.92±5.66 a	0.187±0.010 a	$y=25.80+(81.34-5.80)/(1+x/0.187)^{-0.7686}$	0.9994	5.17
敏感 Sensitive	35.00±2.92 a	0.036±0.004 b	$y=12.46+(102.60-12.46)/(1+x/0.036)^{-0.4884}$	0.9977	1.00

表中数据为平均数±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。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

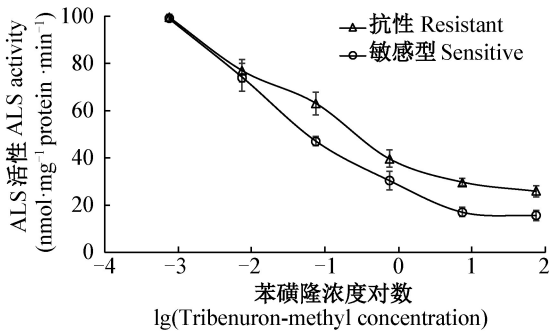


图 1 抗性和敏感型麦家公 ALS 活性对苯磺隆剂量的反应曲线

Fig. 1 Dose-response curves to tribenuron-methyl for ALS isolated from resistant and sensitive *Lithospermum arvense* L. 图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

2.2 苯磺隆对麦家公ALS活体活性的影响

对照组抗性和敏感型麦家公的 ALS 活体活性呈现一定波动,但整体趋于平稳,但 2 个生物型的 ALS 活性差异不显著。苯磺隆药剂处理的抗性和敏感型麦家公 ALS 活体活性分别较其对照组显著降低 ($P<0.05$)。苯磺隆药剂处理后,抗性麦家公的 ALS 活性呈现先轻微升高之后逐渐下降的趋势,药后第 3 天 ALS 活性升至最高,为 35.99 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹,是同期对照组的 72.0%,第 5 天最低,为 24.58 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹,是同期对照组的 70.2%,随后 ALS 活性逐渐恢复上升,第 7 天升至同期对照的 74.0%;苯磺隆药剂处理后,敏感型麦家公的 ALS 活性则不断下降,药后第 7 天降至最低,为 14.55 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹,是为同期对照组的 38.2%,表明其 ALS 活性被抑制(图 2-A)。苯磺隆处理后,虽然 2 个生物型的 ALS 活性均下降,但抗性麦家公的 ALS 活性可逐步恢复,而敏感型麦家公的 ALS 活性则不能恢复。

2.3 苯磺隆对麦家公GST活性的影响

对照组抗性和敏感型麦家公 7 d 的 GST 累计活

性分别为 16.39 U 和 17.30 U,二者之间差异不显著。2 个生物型的 GST 活性均可被苯磺隆诱导,苯磺隆处理后,活性均较其对照显著增加 ($P<0.05$),并呈现先升高后降低的趋势,抗性麦家公 GST 活性在药后第 3 天达最高,为 5.67 U,其活性是同期抗性对照的 1.88 倍;敏感型麦家公 GST 活性在药后第 5 天达到最高,为 4.99 U,是同期敏感对照组的 1.53 倍。抗性麦家公在第 1、2、3、4、7 天的 GST 活性均显著高于敏感型麦家公 ($P<0.05$),第 5、6 天抗性和敏感型麦家公之间差异不显著。抗性麦家公 7 d 的 GST 累计活性为 29.31 U,高于敏感型麦家公 (25.90 U,图 2-B)。表明抗性麦家公 GST 对苯磺隆处理具有更及时的响应和更高的诱导活性,GST 的解毒功能有助于减轻苯磺隆对麦家公的胁迫,增加麦家公对苯磺隆的解毒作用。

2.4 苯磺隆对麦家公 SOD、POD、CAT 活性的影响

2.4.1 苯磺隆对麦家公 SOD 活性的影响

对照组抗性和敏感型麦家公 1~7 d 内 SOD 累计活性分别为 19.31 U 和 24.49 U,后者的 SOD 累计活性显著高于前者 ($P<0.01$),是前者的 1.27 倍。苯磺隆处理后,敏感型麦家公 SOD 活性一直呈现下降趋势,第 7 天降到约为同期对照组的 2/5,为 1.38 U;而抗性麦家公 SOD 活性呈现先下降后上升的趋势,药后第 4 天活性达到同期对照组的 1.44 倍,为 3.45 U,第 7 天回落到同期对照水平,为 2.44 U。表明药剂处理后抗性麦家公较敏感型麦家公有更强的 SOD 活性恢复能力(图 3-A)。

2.4.2 苯磺隆对麦家公POD活性的影响

对照组的抗性和敏感型麦家公 POD 活性在 1~7 d 内存在较大波动,波动范围分别为 126.92~550.68 U 和 93.75~271.04 U,抗性麦家公比敏感型麦家公有更高的 POD 活性。苯磺隆处理后,敏感型麦家公 POD 活性呈先升高后降低的趋势,活性最高出现在药后第 5 天,为 907.22 U,是同期对照组的 3.35 倍,

第7天降到同期对照水平,为268.72 U;抗性麦家公 POD 活性则分别在药后第3、5天出现2个高峰,分别为719.49 U和903.95 U,分别是同期对照组的1.31倍和3.11倍,第7天亦回落到同期对照水平,为299.28 U(图3-B)。

2.4.3 苯磺隆对麦家公CAT活性的影响

对照组抗性和敏感型麦家公 CAT 活性在1~7 d 内波动较大,整体表现为先上升后下降再逐渐平稳的趋势,抗性和敏感型麦家公 CAT 活性变化范围分

别为41.41~77.19 U 和42.17~57.28 U 之间,且抗性麦家公较敏感型麦家公有更高的CAT活性。苯磺隆处理后,抗性麦家公CAT活性先上升后下降最终趋于平稳,第2天活性最高,为61.64 U,第7天回落到同期对照水平,为50.54 U;敏感型麦家公CAT活性在药后开始出现下降,第3天降至最低,为38.92 U,之后缓慢恢复,至第7天恢复至同期对照水平,为45.09 U(图3-C)。

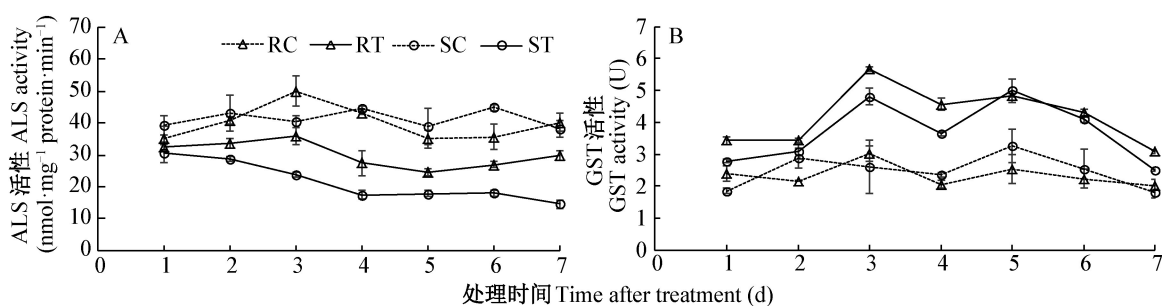


图2 苯磺隆对抗性和敏感型麦家公ALS活体活性(A)和GST活性(B)的影响

Fig. 2 Effects of tribenuron-methyl on *in vivo* ALS activity (A) and GST activity (B) in resistant and sensitive *Lithospermum arvense* L.

图中数据为平均数±标准差。RC: 抗性对照; RT: 抗性处理; SC: 敏感对照; ST: 敏感处理。Data are mean±SD. RC: Resistant control; RT: resistant treatment; SC: sensitive control; ST: sensitive treatment.

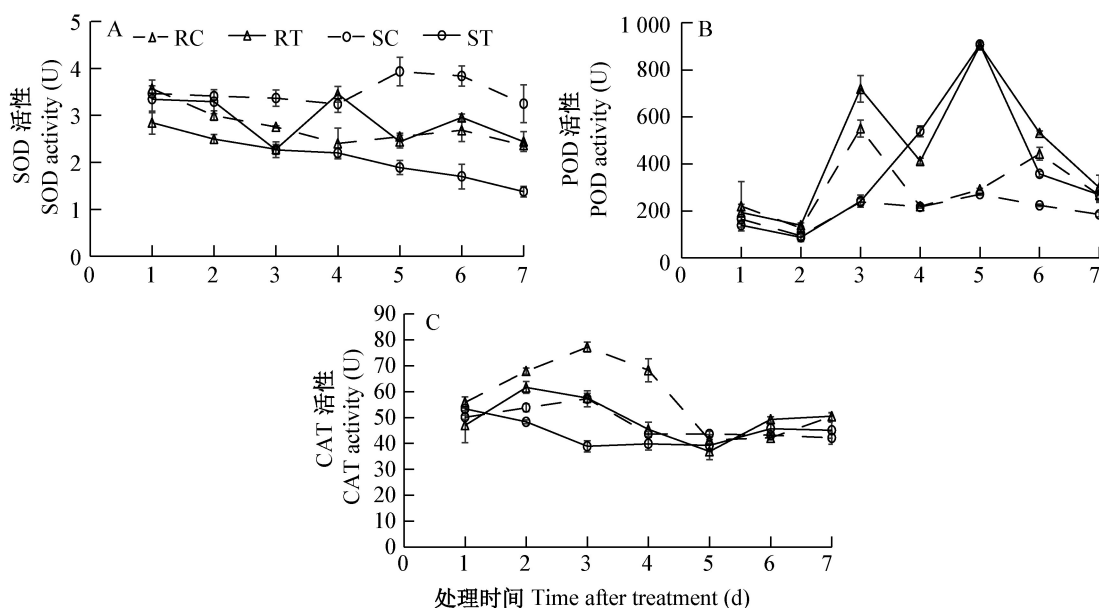


图3 苯磺隆对抗性和敏感型麦家公SOD(A)、POD(B)和CAT(C)活性的影响

Fig. 3 Effects of tribenuron-methyl on SOD (A), POD (B) and CAT (C) activity in resistant and sensitive *Lithospermum arvense* L.

图中数据为平均数±标准差。RC: 抗性对照; RT: 抗性处理; SC: 敏感对照; ST: 敏感处理。Data are mean±SD. RC: Resistant control; RT: resistant treatment; SC: sensitive control; ST: sensitive treatment.

3 讨论

ALS抑制剂类除草剂作用位点单一,杂草容易

对其产生抗药性(张朝贤等,2009; Yu & Powles, 2014a)。本研究结果表明,抗性麦家公靶标酶ALS对苯磺隆敏感性显著降低,这与吴小虎等(2011)的

研究结果吻合,且与播娘蒿(Deng et al., 2017)、荠菜(Zhang et al., 2017)、牛繁缕(Liu et al., 2015b)以及其它杂草(Tranel et al., 2018)对苯磺隆抗性机理的研究结果相一致。由此推测 ALS 对苯磺隆敏感程度下降是麦家公对苯磺隆产生抗性的重要原因。本研究还发现离体条件下抗性和敏感型麦家公的 ALS 总催化活性差异不显著,这与 Han et al. (2012) 和 Liu et al. (2015b) 关于抗苯磺隆播娘蒿、抗苯磺隆牛繁缕的研究结果一致。但是 Yang et al. (2018) 报道抗苯磺隆播娘蒿 pHB42 生物型 ALS 总催化活性与敏感生物型 SD8 一致,抗苯磺隆播娘蒿 pHB8、pHB22、pHB23 和 pHB24 生物型 ALS 总催化活性显著低于敏感生物型 SD8,而抗苯磺隆播娘蒿 pHB25 生物型 ALS 总催化活性显著高于敏感生物型 SD8; Liu et al. (2017) 在比较不同 ALS 突变型牛繁缕 ALS 功能差异时也得到类似结果。目前,未有直接证据表明 ALS 总催化活性与杂草生物型存在直接关系。Yu et al. (2010) 推测,抗性杂草生物型间的 ALS 总催化活性差异可能与其 ALS 发生的突变种类存在关联,但仍有待于对植物 ALS 晶体结构的进一步解析。此外,本研究结果表明,苯磺隆处理后,抗性麦家公 ALS 活体活性逐步恢复,但敏感型麦家公 ALS 活体活性不断下降,其原因可能是由于苯磺隆被吸收传导至作用靶标 ALS 后,抗性麦家公 ALS 活性对苯磺隆的敏感性降低,其活性受抑制程度也较轻,随着药剂不断被代谢,ALS 活性得以逐渐恢复;而敏感型麦家公 ALS 活性被显著抑制,必需氨基酸合成受阻,导致杂草逐步死亡。

GST 在植物应对除草剂等外源物质胁迫等方面有重要作用,植物体内 GST 活性的高低直接影响植物体对除草剂的解毒代谢能力(Marshall et al., 2013),并且杂草体内 GST 可以被除草剂或安全剂诱导表达,从而实现对除草剂的快速代谢(Riechers et al., 2010)。彭学岗等(2009)研究结果表明被苯磺隆诱导后,抗性猪殃殃 GST 活性显著增强,加快对苯磺隆解毒代谢是产生抗药性的一个重要原因;毕亚玲等(2013)在研究荠菜对苯磺隆抗性机理时也得到类似的结果。隋标峰(2007)研究结果表明不同杂草对苯磺隆的敏感性杂草体内初始 GST 含量以及苯磺隆对 GST 的诱导表达量直接相关。本研究结果表明,对照组中的抗性和敏感型麦家公 GST 活性无明显差异,但是苯磺隆处理后,抗性麦家公比敏感型麦家公有更高的 GST 诱导活性,表明 GST 解毒活性增强可能是麦家公对苯磺隆产生抗性的另一原

因。此外, Yu & Powles (2014a) 研究结果表明 P450s 介导的除草剂代谢活性增强是杂草对 ALS 抑制剂类除草剂产生抗性的重要原因,但杂草 P450s 体外活性测定受诸多因素限制,测定成功的案例(Wang et al., 2013)较少,因此,关于 P450s 对麦家公抗苯磺隆的贡献有待进一步研究。

植物体内保护酶 SOD、POD、CAT 可清除除草剂等非生物因素胁迫条件下体内产生的活性氧、自由基而保护细胞膜系统免遭过氧化伤害(陈丽娜等, 2010)。本研究结果表明,苯磺隆处理后,抗性麦家公比敏感型麦家公有更强的 SOD 恢复能力、更高的 POD 活性和 CAT 活性。彭学岗等(2009)研究结果也显示 POD、SOD 在猪殃殃对苯磺隆的抗性中发挥着作用;李永丰等(2015)报道稗 *Echinochloa crus-galli* L.、无芒稗 *E. crus-galli* L. 和稗 *E. crus-galli* L. 体内 SOD、POD、CAT 活性可被噻唑嘧草胺、氰氟草酯诱导,且其活性显著升高,这可能是其对除草剂产生抗性的原因之一。此外,徐田军等(2018)报道 SOD 和 CAT 活性升高有助于增强玉米品种对烟嘧磺隆的抗性。因此,保护酶 SOD、POD、CAT 可能参与了麦家公对苯磺隆的抗性。

本研究证实靶标酶 ALS 对苯磺隆的敏感性减弱是麦家公产生抗性的一个重要原因,解毒酶 GST、SOD、POD 和 CAT 活性升高可能也与抗性有关,下一步研究需明确抗性和敏感型麦家公的 ALS 基因差异性,开展细胞色素 P450 单加氧酶活性差异研究,明确抗性产生的分子机理以及 P450 单加氧酶介导的代谢抗性机理。

参 考 文 献 (References)

- Bi YL, Liu JL, Wang ZZ, Bu DX, Guo WL, Wang JX. 2013. Mechanism of resistance to tribenuron-methyl in a resistant biotype of *Capsella bursa-pastoris* from wheat fields. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 15(2): 171-177 (in Chinese) [毕亚玲, 刘君良, 王兆振, 卜东欣, 郭文磊, 王金信. 2013. 麦田抗性生物型荠菜对苯磺隆的抗性机制研究. *农药学报*, 15(2): 171-177]
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2): 248-254
- Chaleff RS, Mauvais CJ. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224 (4656): 1443-1445
- Chen LN, Tang MD, Ai SY, Li MJ, Zeng ZB, Wang YH. 2010. Growth and physiological response and variance of Pb resistance of three leaf vegetables under Pb stress. *Journal of Plant Resources and Environment*, 19(4): 78-83 (in Chinese) [陈丽娜, 唐明灯,

- 艾绍英, 李盟军, 曾招兵, 王艳红. 2010. Pb胁迫条件下3种叶菜的生长和生理响应及其抗性差异. 植物资源与环境学报, 19(4): 78–83]
- Cui HL, Li XJ, Wang GQ, Wang JP, Wei SH, Cao HY. 2012. Acetolactate synthase proline (197) mutations confer tribenuron-methyl resistance in *Capsella bursa-pastoris* populations from China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 102(3): 229–232
- Cui HL, Wang CY, Xu LL, Li XJ. 2016. Rapid molecular detection of the resistance of *Galium aparine* var. *tenerum* to AHAS inhibitors. Journal of Plant Protection, 43(6): 1049–1054 (in Chinese) [崔海兰, 王藏月, 徐林林, 李香菊. 2016. 猪殃殃对AHAS抑制剂靶标抗性的快速分子检测. 植物保护学报, 43(6): 1049–1054]
- Cui HL, Zhang CX, Wei SH, Zhang HJ, Li XJ, Zhang YQ, Wang GQ. 2011. Acetolactate synthase gene proline (197) mutations confer tribenuron-methyl resistance in flaxweed (*Descurainia sophia*) populations from China. Weed Science, 59(3): 376–379
- 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, Jasieniuk M, Le Corre V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends in Genetics, 29(11): 649–658
- Deng W, Liu MJ, Yang Q, Mei Y, Li XF, Zheng MQ. 2015. Tribenuron-methyl resistance and mutation diversity of Pro197 in flaxweed (*Descurainia sophia* L.) accessions from China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 117: 68–74
- Deng W, Yang Q, Zhang YZ, Jiao HT, Mei Y, Li XF, Zheng MQ. 2017. Cross-resistance patterns to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides of flaxweed (*Descurainia sophia* L.) conferred by different combinations of ALS isozymes with a Pro-197-Thr mutation or a novel Trp-574-Leu mutation. Pesticide Biochemistry and Physiology, 136: 41–45
- Duggleby RG, McCourt JA, Guddat LW. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology and Biochemistry, 46(3): 309–324
- Fan ZJ, Qian CF, Yu WQ, Chen JP, Li ZM, Wang LX. 2003. Study on enzymatic inhibition of acetolactate synthase from maize (*Zea mays* L.) by chlorsulfuron and tribenuron-methyl. Scientia Agricultura Sinica, 36(2): 173–178 (in Chinese) [范志金, 钱传范, 于维强, 陈俊鹏, 李正名, 王玲秀. 2003. 氯磺隆和苯磺隆对玉米乙酰乳酸合成酶抑制作用的研究. 中国农业科学, 36(2): 173–178]
- Gerwick BC, Subramanian MV, Loney-Gallant VI, Chandler DP. 1990. Mechanism of action of the 1,2,4-triazolo [1,5-a] pyrimidines. Pesticide Science, 29: 357–364
- Han XJ, Dong Y, Sun XN, Li XF, Zheng MQ. 2012. Molecular basis of resistance to tribenuron-methyl in *Descurainia sophia* (L.) populations from China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104(1): 77–81
- Heap IM. 2018. The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/Summary/SOASummary.aspx>. 2018-12-20
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR. 1995. Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. Phytochemistry, 39(5): 981–984
- Li HS. 2000. The experimental principle and technology of plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社]
- Li YF, Zhang ZC, Yang X, Dong MC, Zhang B, Han JY. 2015. Susceptibility of weeds in *Echinochloa* to aryloxyphenoxypropionate herbicides and the mechanism. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 31(3): 543–551 (in Chinese) [李永丰, 张自常, 杨霞, 董明超, 张彬, 韩建勇. 2015. 稻田稗属杂草对芳氧苯氧丙酸酯类除草剂的差异敏感性及其机理. 江苏农业学报, 31(3): 543–551]
- Liu WT, Bai S, Jia SS, Guo WL, Zhang LL, Li W, Wang JX. 2017. Comparison of ALS functionality and plant growth in ALS-inhibitor susceptible and resistant *Myosoton aquaticum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology, 142: 111–116
- Liu WT, Wu CX, Guo WL, Du L, Yuan GH, Wang JX. 2015a. Resistance mechanisms to an acetolactate synthase (ALS) inhibitor in water starwort (*Myosoton aquaticum*) populations from China. Weed Science, 63(4): 770–780
- Liu WT, Yuan GH, Du L, Guo WL, Li LX, Bi YL, Wang JX. 2015b. A novel Pro197Glu substitution in acetolactate synthase (ALS) confers broad-spectrum resistance across ALS inhibitors. Pesticide Biochemistry and Physiology, 117: 31–38
- Marshall R, Hanley SJ, Hull R, Moss SR. 2013. The presence of two different target-site resistance mechanisms in individual plants of *Alopecurus myosuroides* Huds., identified using a quick molecular test for the characterisation of six ALS and seven AC-Case SNPs. Pest Management Science, 69(6): 727–737
- McCourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat LW, Duggleby RG. 2006. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(3): 569–573
- Pan L, Gao HT, Xia WW, Zhang T, Dong LY. 2016. Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. Journal of Experimental Botany, 67(6): 1745–1757
- Peng XG, Wang JX, Duan M, Yang JH. 2008. The resistance to tribenuron-methyl in *Galium aparine* in winter wheat fields in northern China. Journal of Plant Protection, 35(5): 458–462 (in Chinese) [彭学岗, 王金信, 段敏, 杨纪辉. 2008. 中国北方部分冬麦区猪殃殃对苯磺隆的抗性水平. 植物保护学报, 35(5): 458–462]
- Peng XG, Wang JX, Liu JL, Yang JH. 2009. Mechanism of resistance to tribenuron-methyl in a resistant biotype of *Galium aparine*. Chinese Journal of Pesticide Science, 11(2): 191–196 (in Chinese) [彭学岗, 王金信, 刘君良, 杨纪辉. 2009. 麦田抗性生物型猪殃殃对苯磺隆的抗性机制. 农药学报, 11(2): 191–196]
- Powles SB, Yu Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbi-

- cides. Annual Review of Plant Biology, 61: 317–347
- Ray TB. 1984. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. Plant Physiology, 75(3): 827–831
- Riechers DE, Kreuz K, Zhang Q. 2010. Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. Plant Physiology, 153(1): 3–13
- Santel HJ, Bowden BA, Sorensen VM, Mueller KH, Reynolds J. 1999. Flucarbazone-sodium: a new herbicide for the selective control of wild oat and green foxtail in wheat.//1999 Brighton Crop Protection Conference: weeds. Brighton, pp. 23–28
- Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst EP. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. Weed Technology, 9(2): 218–227
- Shaner DL, Anderson PC, Stidham MA. 1984. Imidazolinones potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology, 76(2): 545–546
- Stidham MA. 1991. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. Weed Science, 39(3): 428–434
- Sui BF. 2007. Studies on the physiological and biochemical mechanism of sensitivity difference in wheat weeds to tribenuron-methyl. Master Thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [隋标峰. 2007. 麦田杂草对苯磺隆敏感性差异的生理生化机制研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- 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. 2018. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>. 2018-12-20
- Wang HC, Li J, Lü B, Lou YL, Dong LY. 2013. The role of cytochrome P450 monooxygenase in the different responses to fenoxaprop-P-ethyl in annual bluegrass (*Poa annua* L.) and short awned foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). Pesticide Biochemistry and Physiology, 107(3): 334–342
- Wu JC, Xu JF, Feng XM, Liu JL, Qiu HM, Luo SS. 2003. Impacts of pesticides on physiology and biochemistry of rice. Scientia Agricultura Sinica, 36(5): 536–541 (in Chinese) [吴进才, 许俊峰, 冯绪猛, 刘井兰, 邱慧敏, 罗时石. 2003. 稻田常用农药对水稻3个品种生理生化的影响. 中国农业科学, 36(5): 536–541]
- Wu XH, Wang JX, Liu WT, Guo HJ, Cui XY, Chen YB. 2011. Resistance of *Lithospermum arvense* to tribenuron-methyl in winter wheat fields in part of Shandong Province. Chinese Journal of Pesticide Science, 13(6): 597–602 (in Chinese) [吴小虎, 王金信, 刘伟堂, 郭鹤久, 崔夕英, 陈业兵. 2011. 山东省部分市县麦田杂草麦家公 *Lithospermum arvense* 对苯磺隆的抗性. 农药学报, 13(6): 597–602]
- Xu TJ, Lü TF, Zhao JR, Wang RH, Chen CY, Liu YE, Liu XZ, Xing JF, Wang YD, Liu CG. 2018. Effects of herbicides on growth, development and yield of different maize varieties. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 26(8): 1159–1169 (in Chinese) [徐田军, 吕天放, 赵久然, 王荣焕, 陈传永, 刘月娥, 刘秀芝, 邢锦丰, 王元东, 刘春阁. 2018. 除草剂对不同玉米品种生长发育和产量的影响. 中国生态农业学报, 26(8): 1159–1169]
- Yang Q, Deng W, Li XF, Yu Q, Bai LY, Zheng MQ. 2016. Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flaxweed (*Descurainia sophia* L.). BMC Genomics, 17: 551
- Yang Q, Deng W, Wang S, Liu H, Li X, Zheng MQ. 2018. Effects of resistance mutations of Pro197, Asp376 and Trp574 on the characteristics of acetohydroxyacid synthase (AHAS) isozymes. Pest Management Science, 74(8): 1870–1879
- Yu Q, Han H, Vila-Aiub MM, Powles SB. 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. Journal of Experimental Botany, 61(14): 3925–3934
- 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
- Yu Q, Powles SB. 2014a. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. Pest Management Science, 70(9): 1340–1350
- Zhang CX, Ni HW, Wei SH, Huang HJ, Liu Y, Cui HL, Sui BF, Zhang M, Guo F. 2009. Current advances in research on herbicide resistance. Scientia Agricultura Sinica, 42(4): 1274–1289 (in Chinese) [张朝贤, 倪汉文, 魏守辉, 黄红娟, 刘延, 崔海兰, 隋标峰, 张猛, 郭峰. 2009. 杂草抗药性研究进展. 中国农业科学, 42(4): 1274–1289]
- Zhang LL, Guo WL, Li Q, Wu CX, Zhao N, Liu WT, Wang JX. 2017. Tribenuron-methyl resistance and mutation diversity of the AHAS gene in shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.) in Henan Province, China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 143: 239–245
- Zhao N, Li W, Bai S, Guo W, Yuan G, Wang F, Liu W, Wang J. 2017. Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*. Frontiers in Plant Science, 8: 1391
- Zhao SJ, Shi GA, Dong XC. 2002. Experimental guidelines for plant physiology. Beijing: China Agricultural University Press (in Chinese) [赵世杰, 史国安, 董新纯. 2002. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业大学出版社]

(责任编辑: 张俊芳)