

河南省多花黑麦草对 ACCase 和 ALS 抑制剂的抗性及其靶标基因突变分析

徐洪乐¹ 冷秋丽¹ 闵红² 郝瑞² 孙兰兰¹ 薛飞¹ 苏旺苍^{1*} 吴仁海^{1*}

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002; 2. 河南省植物保护植物检疫站, 郑州 450002)

摘要: 为明确河南省部分地区的多花黑麦草 *Lolium multiflorum* 种群对乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACCase) 和乙酰乳酸合成酶 (acetolactate synthase, ALS) 抑制剂类除草剂的抗性水平和抗性机理, 采用整株生物测定法测定采自新乡市和驻马店市的多花黑麦草种群对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵、炔草酯、唑啉草酯和 ALS 抑制剂类除草剂甲基二磺隆、氟唑磺隆、啶磺草胺的抗性水平, 并对多花黑麦草 ACCase 和 ALS 靶标酶编码基因进行克隆及氨基酸序列比对, 分析其靶标抗性机理。结果显示, 与多花黑麦草敏感种群 HNXX01 相比, HNZMD04 和 HNXX05 种群对 6 种除草剂均产生了抗性, HNZMD04 种群对精噁唑禾草灵和啶磺草胺的相对抗性倍数分别为 44.65 和 40.31, 对炔草酯和氟唑磺隆的相对抗性倍数分别为 11.91 和 11.93; HNXX05 种群对精噁唑禾草灵和氟唑磺隆的相对抗性倍数分别为 27.70 和 25.67。HNZMD04 和 HNXX05 抗性种群的 ACCase 基因均发生了 D2078G 突变, 2 个种群的突变率分别为 55% 和 70%; HNZMD04 抗性种群的 ALS 基因发生了 P197Q 和 P197T 突变, 突变率分别为 30% 和 5%, 而 HNXX05 抗性种群的 ALS 基因仅发生了 P197Q 突变, 突变率为 15%。表明多花黑麦草驻马店种群和新乡种群对 ACCase 和 ALS 抑制剂类除草剂均产生较高抗性, 而抗性多花黑麦草的 ACCase 氨基酸 D2078G 突变和 ALS 氨基酸 P197Q 及 P197T 突变是其产生抗药性的原因之一。

关键词: 多花黑麦草; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 乙酰乳酸合成酶; 抗药性; 抗性机理

Resistance to ACCase and ALS inhibitors and its target site mutation in Italian ryegrass *Lolium multiflorum* from Henan Province

Xu Hongle¹ Leng Qiuli¹ Min Hong² Hao Rui² Sun Lanlan¹ Xue Fei¹ Su Wangcang^{1*} Wu Renhai^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, Henan Province, China;

2. Henan Plant Protection and Plant Quarantine Station, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: To clarify the resistance level to acetyl-CoA carboxylase (ACCase) and acetolactate synthase (ALS) inhibitor herbicides and target site resistance mechanism in Italian ryegrass *Lolium multiflorum* populations from some areas of Henan Province, the whole-plant bioassays were conducted to determine the resistance of HNXX01, HNZMD04, HNXX05 populations against ACCase inhibitor herbicides (fenoxaprop-*P*-ethyl, clodinafop-propargyl, and pinoxaden) and ALS inhibitor herbicides (mesosulfuron-methyl, flucarbazone-sodium, and pyroxsulam). The ACCase and ALS target enzyme genes were cloned from these populations, and compared with amino acid sequence to find resistance-related mutations and clarify the mechanism of target site resistance. The results of resistance level test showed that HNZMD04 and HNXX05 populations were resistant to all the six herbicides compared to susceptible

基金项目: 河南省农业科学院杰出青年科技基金(2022JQ04), 国家重点研发计划(2017YFD0201703), 河南省农业科学院基础性科研项目(2022JC15)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: suwangcang@126.com, renhai.wu@163.com

收稿日期: 2021-03-29

ble population HNXX01. HNXX01 population was resistant to fenoxaprop-*P*-ethyl and pyroxsulam, with a relative resistance factor of 44.65 and 40.31, respectively. The relative resistance factor of HNXX01 to clodinafop-propargyl and flucarbazone-sodium were 11.91 and 11.93, respectively. The relative resistance factor of HNXX05 population to fenoxaprop-*P*-ethyl and flucarbazone-sodium were 27.70 and 25.67, respectively. The results showed that the *ACCase* gene had a D2078G mutation in HNXX01 and HNXX05 resistant populations, with a mutation rate of 55% and 70%, respectively. The *ALS* gene had P197Q and P197T mutations in HNXX01 resistant population, with a mutation rate of 30% and 5%, respectively, while the *ALS* gene only had P197Q mutation in HNXX05 resistant population, with a the mutation rate of 15%. These results indicated that *L. multiflorum* populations from Zhumadian and Xinxiang developed high resistance to ACCase and ALS inhibitor herbicides. Furthermore, ACCase mutation at amino acid D2078G and ALS mutations at amino acids P197Q and P197T contributed the herbicide resistance in the *L. multiflorum* populations from Henan.

Key words: *Lolium multiflorum*; acetyl-CoA carboxylase (ACCase); acetolactate synthase (ALS); herbicide resistance; resistance mechanism

多花黑麦草 *Lolium multiflorum* 属禾本科单子叶草本, 作为优良牧草在我国多地引种种植。引进的多花黑麦草多种植在我国河南省、江苏省及湖北省, 然而近年来多花黑麦草逐渐蔓延成为小麦田中的一种恶性杂草, 严重影响小麦生产(王合松等, 2008)。目前, 防除小麦田多花黑麦草的除草剂主要分为2大类, 一类是乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCase)抑制剂类除草剂, 另一类是乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS)抑制剂类除草剂; ACCase抑制剂类除草剂包括草酯、精噁唑禾草灵和唑啉草酯等, ALS抑制剂类除草剂包括甲基二磺隆和啶磺草胺等(鲁传涛, 2014)。

近年来, 由于除草剂的长期使用, 多花黑麦草对多种除草剂产生了抗性, 使其成为麦田最难防除的杂草之一(Stone et al., 1998)。最早在1987年发现美国俄勒冈州小麦田中的多花黑麦草对 ACCase 抑制剂禾草灵产生了抗性, 并危害小麦(Stanger & Appleby, 1989), 随后, 在英国、丹麦、法国以及阿根廷等国家也报道了多花黑麦草对禾草灵以及烯草酮等均产生了不同程度的抗性(Greenwood et al., 1999; Beckie & Tardif, 2012; Délye et al., 2013; Nandula, 2014)。Taylor & Coats(1996)在美国密西西比州路边发现的多花黑麦草对磺酰脲类除草剂产生了抗性; Tucker et al.(2006)在德克萨斯州发现多花黑麦草对醚苯磺隆的敏感性较低; Kuk & Burgos(2007)报道多花黑麦草对甲基二磺隆、甲氧咪草烟、氯磺隆和甲嘧磺隆均已产生抗性, 且多花黑麦草对甲基二磺隆的抗性机制是由靶标酶的改变导致。国外对多花黑麦草的抗药性研究报道较多, 但多花黑麦草是

国内近年来发生的恶性杂草, 因此在国内多花黑麦草对 ACCase 抑制剂类除草剂的抗性报道相对较少, 且尚未有多花黑麦草对 ALS 抑制剂类除草剂抗性的相关报道。姜群峰和李晓霞(2002)研究发现多花黑麦草对高效氟吡甲禾灵和精噁唑禾草灵有一定程度的耐药性。张佩(2018)研究报道河南和江苏等省小麦田中的多花黑麦草对精噁唑禾草灵的抗性特别严重, 尤其是以驻马店市和连云港市赣榆区等地多花黑麦草的抗性水平较高; 且驻马店市多花黑麦草对精噁唑禾草灵产生抗性的原因是发生 D2078G、C2088R、I1781L 和 I2041N 突变。

本研究以来自河南省新乡市获嘉县、驻马店市汝南县和新乡市原阳县的3个多花黑麦草种群为试验材料, 采用整株生物测定法分析其对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵、炔草酯、唑啉草酯和 ALS 抑制剂类除草剂甲基二磺隆、氟唑磺隆、啶磺草胺的抗性水平, 通过对多花黑麦草种群 ACCase 和 ALS 靶标酶基因序列的分析, 解析抗性相关的基因突变, 明确靶标酶抗性机理, 以期对小麦田多花黑麦草的防治提供理论依据及实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试多花黑麦草: 该杂草种子分别于2016年采集自河南省新乡市获嘉县水塘边(HNXX01)和原阳县小麦田(HNXX05)、于2017年采集自河南省驻马店汝南县小麦田(HNZMD04)。前期经预试验已确定 HNXX01 种群对 ACCase 和 ALS 抑制剂类除草剂敏感; HNXX05 种群为疑似抗精噁唑禾

草灵种群。以上种子均为成熟种子,自然风干贮藏备用。

除草剂:69 g/L 精噁唑禾草灵(fenoxaprop-*P*-ethyl)乳油,拜耳作物科学(中国)有限公司;15% 炔草酯(clodinafop-propargyl)微乳剂和5% 唑啉草酯(pinoxaden)乳油,先正达(中国)投资有限公司;30 g/L 甲基二磺隆(mesosulfuron-methyl)油悬浮剂,拜耳作物科学(中国)有限公司;70% 氟唑磺隆(flucarbazone-sodium)水分散粒剂,日本爱利思达有限公司;7.5% 啶磺草胺(pyroxulam)水分散粒剂,美国陶氏益农公司。

试剂和仪器:DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;栽培基质,品氏托普园艺(上海)有限公司;2×PCR Mix,东盛生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。PQX-450A 型光照培养箱,宁波莱福科技有限公司;3W-2000 型行走式生测喷雾塔,南京农业机械化研究所;C1000 Touch 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 多花黑麦草对 ACCase 和 ALS 抑制剂的敏感性测定

参照各药剂的田间推荐剂量设置系列浓度,对于敏感种群 HNXX01,精噁唑禾草灵浓度分别为 3.88、7.75、15.5、31、62 和 124 g (a.i.)/hm²,炔草酯浓度分别为 4.22、8.44、16.88、33.75、67.5 和 135 g (a.i.)/hm²,唑啉草酯浓度分别为 3.25、7.5、15、30、60 和 120 g (a.i.)/hm²,甲基二磺隆浓度分别为 0.98、1.97、3.94、7.88、15.75 和 31.5 g (a.i.)/hm²,氟唑磺隆浓度分别为 1.31、2.625、5.25、10.5、21 和 42 g (a.i.)/hm²,啶磺草胺浓度分别为 0.44、0.88、1.75、3.5、7 和 14 g (a.i.)/hm²;对于抗性种群 HNZMD04 和 HNXX05,精噁唑禾草灵浓度分别为 62、124、248、496、992 和 1 984 g (a.i.)/hm²,炔草酯浓度分别为 16.88、33.75、67.5、135、270 和 540 g (a.i.)/hm²,唑啉草酯浓度分别为 15、30、60、120、240 和 480 g (a.i.)/hm²,甲基二磺隆浓度分别为 3.94、7.88、15.75、31.5、63 和 126 g (a.i.)/hm²,氟唑磺隆浓度分别为 10.5、21、42、84、168、336 和 672 g (a.i.)/hm²,啶磺草胺浓度分别为 1.75、3.5、7、14、28 和 56 g (a.i.)/hm²。

采用整株生物测定法测定多花黑麦草 HNXX01、HNZMD04 和 HNXX05 种群对 ACCase 和 ALS 抑制剂的敏感性。选择适量的、籽粒饱满的多花黑麦草 HNXX01、HNZMD04 和 HNXX05 种群的种子,将其分别放入铺有滤纸的托盘里,加入适量蒸馏水以保持湿润状态,然后盖上保鲜膜,在膜上扎一

些小孔保持透气,把托盘放在室温 20℃ 进行播种前的催芽处理。等待 3~4 d,观察催芽情况。将农田土与栽培基质按质量比 3:2 的比例混合均匀过筛,装入底部带孔的直径约 7 cm、深约 9 cm 的黑色小塑料盆内,把装有栽培土的塑料盆放入托盘中,在托盘中加入适量水,让塑料盆从底部吸水至土壤浸润。选取发芽比较一致的种子,每盆种植 10 株,使其根部朝下,芽朝上,并覆盖 0.5 cm 厚的薄土。将其置于温度白天约 25℃/夜晚约 18℃、光周期 12 L:12 D 的光照培养箱中培养,待出苗整齐后,每盆定苗至 7 株。待多花黑麦草生长至 3~4 叶期,利用喷雾塔进行茎叶喷雾,施药量为 450 L/hm²,每个剂量处理重复 4 次,1 个重复为 1 盆,以清水喷施作为空白对照。待药剂晾干后将所有处理的多花黑麦草继续放入光照培养箱培养,条件同上。药后 21 d,剪取并称量多花黑麦草地上部分鲜重,计算鲜重抑制率。鲜重抑制率=(空白对照鲜草重-处理鲜草重)/空白对照鲜草重×100%。采用 DPS 18.10 软件对药剂剂量的对数值 x 与鲜重抑制率的概率值 y 进行回归分析,得出回归方程、相关系数以及抑制杂草生长的除草剂中剂量 ED₅₀,并计算出相对抗性倍数,相对抗性倍数=药剂对多花黑麦草抗性种群的 ED₅₀ 值/药剂对多花黑麦草敏感种群的 ED₅₀ 值。

1.2.2 ACCase 和 ALS 基因的克隆及序列分析

根据多花黑麦草 ACCase 基因序列(GenBank 登录号 AY710293)和 ALS 基因序列(GenBank 登录号 MK922479)分别设计两者的特异性扩增引物(表 1),以克隆多花黑麦草 ACCase 和 ALS 基因,克隆片段包含所有已报道的 ACCase 突变位点(第 1 781、1 999、2 027、2 041、2 078、2 088 和 2 096 位)及 ALS 突变位点(第 122、197、205、376、377、574、653 和 654 位)。按 1.2.1 方法培养多花黑麦草,待生长至 3 叶期,分别剪取多花黑麦草的新鲜茎叶组织 0.1 g,采用 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA,作为模板进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系:模板 DNA 1 μL、正反向引物各 2 μL、2×PCR Mix 25 μL、ddH₂O 20 μL。反应程序:98℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,61.0℃ 或 57.6℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 10 s,共 35 个循环;72℃ 终延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,用 PCR 产物回收试剂盒进行回收纯化。回收纯化的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序获得的序列与大穗看麦娘 *Alopecurus myosuroides* 的 ACCase(GenBank 登录号为 AJ310767)和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 ALS 基

因的氨基酸序列(GenBank 登录号为 X51514)进行 比对分析。

表 1 本研究所用 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primers in the study

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	目的基因 Target gene	产物大小 Product size/bp	退火温度 Annealing temperature/℃
ACCp F	AATGGGTCGTGGGGCACTCCTATAATTCC	ACCase	1 600	61.0
ACCp R	CTCCCTGGAGTTGTGCTTTC			
ALS 2F	GTCACCTACTGCCCTCCTCA	ALS	1 836	57.6
ALS 2R	TCCTGCCATCACCTTCCA			

2 结果与分析

2.1 多花黑麦草对 ACCase 和 ALS 抑制剂类除草剂的抗性

抗药性检测结果显示,与对照敏感种群 HNXX01 相比,HNZMD04 和 HNXX05 种群对 6 种除草剂均

产生了较高水平的抗性,HNZMD04 种群对精噁唑禾草灵和啶磺草胺的相对抗性倍数分别达 44.65 和 40.31,对炔草酯和氟唑磺隆的相对抗性倍数分别达 11.91 和 11.93;HNXX05 种群对精噁唑禾草灵和氟唑磺隆的相对抗性倍数分别达 27.70 和 25.67(表 2)。

表 2 不同多花黑麦草种群对 ACCase 和 ALS 抑制剂类除草剂的抗性水平

Table 2 The sensitivity of different *Lolium multiflorum* populations to ACCase and ALS inhibitors

除草剂类别 Herbicide group	除草剂 Herbicide	种群 Population	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	抑制中剂量 ED ₅₀	相对抗性倍数 Relative resistance factor	
ACCase抑制剂	精噁唑禾草灵	HNXX01	y=1.045x+3.379	0.864	35.66	—	
ACCase inhibitor	Fenoxaprop- <i>P</i> -ethyl	HNZMD04	y=1.085x+1.526	0.932	1 592.24	44.65	
		HNXX05	y=0.695x+2.920	0.927	987.69	27.70	
		炔草酯	HNXX01	y=1.275x+3.853	0.975	7.93	—
	Clodinafop-ropargyl	HNZMD04	y=1.098x+2.832	0.994	94.43	11.91	
		HNXX05	y=1.050x+3.128	0.977	60.54	7.63	
		唑啞草酯	HNXX01	y=3.543x+2.827	0.966	4.10	—
	Pinoxaden	HNZMD04	y=4.019x-0.796	0.805	27.67	6.75	
		HNXX05	y=4.289x-1.108	0.947	31.20	7.61	
		ALS抑制剂	甲基二磺隆	HNXX01	y=1.486x+4.606	0.886	1.84
	ALS inhibitor	Mesosulfuron-methyl	HNZMD04	y=1.851x+2.995	0.974	12.11	6.58
HNXX05			y=1.300x+3.944	0.982	6.49	3.53	
氟唑磺隆			HNXX01	y=1.888x+3.487	0.986	6.33	—
Flucarbazone-sodium		HNZMD04	y=0.971x+3.178	0.967	75.50	11.93	
		HNXX05	y=0.926x+2.952	0.974	162.52	25.67	
		啞磺草胺	HNXX01	y=1.293x+5.305	0.941	0.58	—
Pyroxsulam		HNZMD04	y=1.649x+2.743	0.984	23.38	40.31	
		HNXX05	y=1.502x+4.711	0.943	1.56	2.69	

y: 鲜重抑制率的概率值; x: 药剂剂量的对数值。y: Probability of fresh weight inhibition rate; x: logarithm of dosage.

2.2 多花黑麦草 ACCase 和 ALS 基因序列分析

对多花黑麦草 3 个种群的 ACCase 和 ALS 基因进行克隆,将克隆的基因序列与大穗看麦娘的 ACCase 和拟南芥的 ALS 基因的氨基酸序列进行比对,结果显示,多花黑麦草 HNZMD04 和 HNXX05 种群均发生了靶标位点的突变(图 1)。其中,HNZMD04 和 HNXX05 种群的 ACCase 基因发生了 D2078G 突变,突变率分别为 55% 和 70%;HNZMD04 种群的 ALS 基因发生了 P197Q 和 P197T 突变,突变率分别为

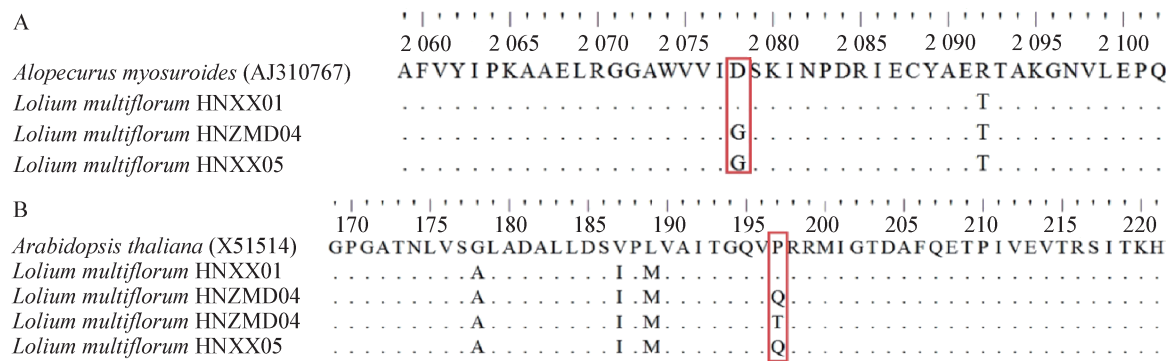
30% 和 5%;而 HNXX05 种群的 ALS 基因仅发生了 P197Q 突变,突变率为 15%(表 3)。

3 讨论

多花黑麦草近年来在河南省驻马店市等地大面积发生,严重影响小麦生产(吴仁海等,2017)。化学防除是杂草防治最直接有效的方法,然而陆续报道多花黑麦草对多种药剂产生了抗性(Cocker et al., 2001; Alarcón-Reverte & Moss, 2008; Ellis et al.,

2009)。本研究通过整株生物测定法明确了多花黑麦草 HNXX01、HNZMD04 和 HNXX05 种群对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵、炔草酯、唑啉草酯和 ALS 抑制剂类除草剂甲基二磺隆、氟唑磺隆、啶磺草胺的抗性水平,结果表明,多花黑麦草 HNZMD04 和 HNXX05 种群对这 6 种除草剂均产生了抗性,尤其是采自驻马店市汝南县的 HNZMD04 种群对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵和炔

草酯以及 ALS 抑制剂类除草剂氟唑磺隆和啶磺草胺产生较高抗性,而采自新乡市原阳县的 HNXX05 种群对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵和 ALS 抑制剂类除草剂氟唑磺隆产生较高抗性。张佩(2018)发现河南省驻马店市多个多花黑麦草种群对 ACCase 抑制剂类除草剂精噁唑禾草灵产生不同程度的抗性,但并未发现其对 ALS 抑制剂类除草剂产抗性。



红色框所示为靶标位点的突变。The red boxed codon indicates the mutations.

图1 不同多花黑麦草种群的 ACCase(A)和 ALS(B)部分氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of partial amino acid sequences of the ACCase and ALS derived from different *Lolium multiflorum* populations

表3 多花黑麦草不同种群 ACCase 和 ALS 的抗性突变情况

Table 3 Amino acid substitutions related to herbicide resistance in ACCase and ALS in different *Lolium multiflorum* populations.

种群 Population	敏感性 Sensitivity	ACCase 基因突变 ACCase gene mutation			ALS 基因突变 ALS gene mutation		
		突变类型 Mutation	突变株数/总株数 Mutant/total plant	突变率 Mutation frequency/%	突变类型 Mutation	突变株数/总株数 Mutant/total plant	突变率 Mutation frequency/%
HNXX01	敏感 Sensitive	野生型 Wild type	0/10	0	野生型 Wild type	0/10	0
HNZMD04	多抗性 Multi-resistant	D2078G (GAT-2078-GGT)	11/20	55	P197Q (CCG-197-CAG)	6/20	30
					P197T (CCG-197-ACG)	1/20	5
HNXX05	多抗性 Multi-resistant	D2078G (GAT-2078-GGT)	14/20	70	P197Q (CCG-197-CAG)	3/20	15

ACCase 抑制剂类除草剂主要用于选择性防除禾本科杂草,ACCase 抑制剂类除草剂可以抑制 ACCase 的活性,导致脂肪酸的合成被阻断,使得脂质缺少,膜的完整性被破坏,造成植物死亡(Délye et al., 2005)。此类除草剂作用于禾本科杂草同质型 ACCase 的 CT 功能域(Rendina et al., 1990)。同质型 ACCase 的 CT 区域基因发生突变后会导致 ACCase 的分子结构发生改变,使得其对除草剂的敏感性降低,从而导致杂草对此类除草剂产生抗性(Kaundun, 2014)。Zagnitko et al. (2001)首次报道硬直黑麦草 *Lolium rigidum* 对氟吡甲禾灵和烯禾啶产

生抗性是由于 ACCase 基因的 CT 区域异亮氨酸/亮氨酸突变。目前共报道了 ACCase 基因的 CT 区域有 7 个位点的氨基酸突变,以及 14 种抗性突变类型 G2096A/S、C2088R、D2078G、I2041N/V、W2027C、W1999C/L/S 和 I1781L/V/A/T(郭文磊, 2017)。张佩(2018)对抗性多花黑麦草种群 ACCase 基因序列进行研究,其中来自河南省驻马店的 3 个抗性种群中第 2 078 位天冬氨酸均突变为为了甘氨酸;除此之外,该研究还发现河南省驻马店的多花黑麦草种群产生了 I1781L、C2088R 和 I2041N 突变,导致多花黑麦草对精噁唑禾草灵产生了抗性。本研究发现多花黑麦

草 HNZMD04 和 HNXX05 种群的 ACCase 基因发生了 D2078G 突变, 该结果与张佩(2018)研究结果一致。因此, ACCase 基因发生 D2078G 突变是多花黑麦草驻马店汝南种群和新乡原阳种群对 ACCase 抑制剂类除草剂产生抗性的重要靶标机理。

ALS 抑制剂类除草剂是内吸传导型除草剂, 会在杂草分生组织内累积, 抑制 ALS 活性, 影响杂草支链氨基酸合成, 导致杂草不能有丝分裂, 从而不再生长, 最终导致杂草死亡(张乐乐, 2018)。ALS 抑制剂类除草剂作用于 ALS, 杂草对此类除草剂产生抗性是由于靶标酶基因发生突变, 使得其对除草剂的敏感性降低。Guttieri et al. (1992) 首次报道了 P197T 和 P197H 氨基酸突变是造成野苣荬 *Lactuca scariola* 和地肤 *Kochia scoparia* 对磺酰脲类除草剂氯磺隆产生抗性的重要原因。据报道, ALS 基因序列中存在 8 个位点的氨基酸突变, 28 种以上的氨基酸突变类型(Yu & Powles, 2014)。Yu et al. (2003) 发现 8 个野萝卜 *Raphanus raphanistrum* 抗性种群对 ALS 除草剂的抗性不仅与 P197 靶标位点突变有关, 还可能与酶活性的升高有关, 但通过 Northern blot 分析发现抗敏生物型 ALS 的 mRNA 表达水平没有明显差异。Yu et al. (2007) 报道 3 个对磺酰磺隆产生抗性的大麦属杂草 *Hordeum leporinum* 生物型不仅含有 P197S 突变, 导致靶标酶敏感性降低, 而且抗性生物型 ALS 活力均比敏感生物型高 2~3 倍。本研究结果表明, 多花黑麦草 HNZMD04 种群的 ALS 基因发生了 P197Q 和 P197T 突变, HNXX05 种群的 ALS 基因发生了 P197Q 突变, 该结果与上述报道的结果一致, 即 ALS 第 197 位氨基酸突变可导致杂草对该类药剂产生抗性。本研究证实 ALS 基因第 197 位氨基酸点突变使得多花黑麦草驻马店汝南种群和新乡原阳种群对 ALS 抑制剂类除草剂产生了抗性, 这是国内首次明确了多花黑麦草对 ALS 抑制剂的抗性及其靶标抗性机理。

杂草对除草剂的抗性可分为靶标抗性和非靶标抗性, 靶标抗性包括除草剂位点改变及过量表达等; 非靶标抗性包括代谢解毒能力增强、屏蔽作用或与作用位点的隔离等(李健等, 2016)。本研究对多花黑麦草的抗性机理进行了初步研究, 为小麦田多花黑麦草的防除提供了有力的科学依据和实践指导, 但本研究在靶标抗性方面仅研究了靶标酶基因突变, 而多花黑麦草 ACCase 和 ALS 基因的表达量等情况还需进一步明确, 多花黑麦草对 ACCase 和 ALS 抑制剂的抗性机理除了靶标抗性外, 还需进一步研

究明确其非靶标抗性机理。

多花黑麦草已对多种除草剂产生了抗性, 应根据除草剂的作用机理、抗性水平和抗性机理的不同, 将各种作用机理的除草剂混用或轮换使用, 避免单一使用一种作用机制的药剂, 减少施药剂量, 延缓抗药性发展, 科学防除抗性多花黑麦草(李美等, 2016)。张佩(2018)根据各种除草剂的使用方法 & 特点, 通过降低用药量和用药次数, 筛选复配剂, 可以达到延缓抗药性发展的目的。另外, 国内外学者研究表明小麦田土壤封闭除草剂的使用也是延缓抗药性、进行杂草综合防治的重要策略之一(Colbach et al., 2016; 范志业等, 2017)。建议根据多花黑麦草抗性现状采用具有针对性的科学防控技术进行防治。

参 考 文 献 (References)

- Alarcón-Reverte R, Moss SR. 2008. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Lolium multiflorum*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 73(4): 899–902
- Beckie HJ, Tardif FJ. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35: 15–28
- Cocker KM, Northcroft DS, Coleman JO, Moss SR. 2001. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides and isoproturon in UK populations of *Lolium multiflorum*: mechanisms of resistance and implications for control. *Pest Management Science*, 57(7): 587–597
- Colbach N, Chauvel B, Darmency H, Délye C, Le Corre V. 2016. Choosing the best cropping systems to target pleiotropic effects when managing single-gene herbicide resistance in grass weeds: a blackgrass simulation study. *Pest Management Science*, 72 (10): 1910–1925
- Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11): 649–658
- Délye C, Zhang XQ, Michel S, Matějček A, Powles SB. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, 137(3): 794–806
- Ellis AT, Morgan GD, Mueller TC. 2008. Mesosulfuron-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Texas. *Weed Technology*, 22(3): 431–434
- Fan ZY, Shen HL, Chen Q, Liu D, Hou YH, Li SM. 2017. Control effects of diflufenican·flufenacet·flurtamone 360 g/L SC on broad-leaf weeds in winter wheat field with soil and foliar treatment. *Agrochemicals*, 56(1): 65–68 (in Chinese) [范志业, 沈海龙, 陈琦, 刘迪, 侯艳红, 李世民. 2017. 吡氟·氟噻·呋草酮悬浮剂土壤封闭和茎叶处理对冬小麦田阔叶杂草的防除效果比较. *农药*, 56(1): 65–68]
- Greenwood M, Gemmell J, Sinclair W, Marshall G, Mortimer AM, Putwain PD. 1999. Extent of resistance of ACCase inhibiting herbicides in UK populations of wild oat (*Avena* sp.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). // *Proceedings of an international con-*

- ference, Brighton, UK, 15–18 November 1999. Farnham, UK: British Crop Protection Council, pp. 563–564
- Guo WL. 2017. Resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis*) from wheat fields. PhD thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [郭文磊. 2017. 小麦田看麦娘(*Alopecurus aequalis*)对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆抗性研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Guttieri MJ, Eberlein CV, Mallory-Smith CA, Thill DC, Hoffman DL. 1992. DNA sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and-susceptible weed biotypes. *Weed Science*, 40(4): 670–677
- Kaundun SS. 2014. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, 70(9): 1405–1417
- Kuk YI, Bugos NR. 2007. Cross-resistance profile of mesosulfuron-methyl-resistant Italian ryegrass in the southern United States. *Pest Management Science*, 63(4): 349–357
- Li J, Li M, Gao XX, Fang F, Dong LH. 2016. Herbicide resistance and its mechanism of weed. *Shandong Agricultural Sciences*, 48(12): 165–170 (in Chinese) [李健, 李美, 高兴祥, 房锋, 董连红. 2016. 杂草抗药性及其机理研究进展. *山东农业科学*, 48(12): 165–170]
- Li M, Gao XX, Li J, Fang F, Sun ZW. 2016. Occurrence status, control difficulties and control techniques of weeds in winter wheat field in Huang-Huai-Hai region. *Shandong Agricultural Sciences*, 48(11): 119–124 (in Chinese) [李美, 高兴祥, 李健, 房锋, 孙作文. 2016. 黄淮海冬小麦田杂草发生现状、防除难点及防控技术. *山东农业科学*, 48(11): 119–124]
- Lou QF, Li XX. 2002. Study on the sensitivity of *Lolium multiflorum* to common herbicides. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 30(6): 44–45 (in Chinese) [娄群峰, 李晓霞. 2002. 多花黑麦草对常用除草剂的敏感性研究. *江苏农业科学*, 30(6): 44–45]
- Lu CT. 2014. Primary color illustration of weed identification and control in farmland. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [鲁传涛. 2014. 农田杂草识别与防治原色图鉴. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- Nandula VK. 2014. Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) and corn (*Zea mays*) competition. *American Journal of Plant Sciences*, 5(26): 3914–3924
- Rendina AR, Craig-Kennard AC, Beaudoin JD, Breen MK. 1990. Inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by two classes of grass-selective herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5): 1282–1287
- Stanger CE, Appleby AP. 1989. Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) accessions tolerant to diclofop. *Weed Science*, 3(3): 350–353
- Stone MJ, Cralle HT, Chandler JM, Miller TD, Bovey RW, Carson KH. 1998. Above- and belowground interference of wheat (*Triticum aestivum*) by Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Weed Science*, 46(4): 438–441
- Taylor JM, Coats GE. 1996. Identification of sulfometuron-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) selections. *Weed Technology*, 10(4): 943–946
- Tucker KP, Morgan GD, Senseman SA, Miller TD, Baumann PA. 2006. Identification, distribution, and control of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) ecotypes with varying levels of sensitivity to triasulfuron in Texas. *Weed Technology*, 20(3): 745–750
- Wang HS, Song YL, Li JY, Yang GQ, He WL, Luo ZW. 2008. Watch out for the spread of ryegrass in wheat fields. *Plant Protection*, 34(2): 149–151 (in Chinese) [王合松, 宋玉立, 李九英, 杨共强, 贺文兰, 罗中伟. 2008. 警惕麦田恶性杂草黑麦草蔓延危害. *植物保护*, 34(2): 149–151]
- Wu RH, Sun HH, Su WC, Xu HL, Wang HL, Lu CT, Wei HM, Xue F. 2017. Synergistic effect on *Lolium multiflorum* Lamk. and security to wheat of flufenacet and pendimethalin. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 46(6): 89–92 (in Chinese) [吴仁海, 孙慧慧, 苏旺苍, 徐洪乐, 王恒亮, 鲁传涛, 魏红梅, 薛飞. 2017. 氟噻草胺与二甲戊灵混配对多花黑麦草的协同控制作用及对小麦的安全性. *河南农业科学*, 46(6): 89–92]
- Yu Q, Nelson JK, Zheng MQ, Jackson M, Powles SB. 2007. Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Management Science*, 63(9): 918–927
- Yu Q, Powles SB. 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science*, 70(9): 1340–1350
- Yu Q, Zhang XQ, Hashem A, Walsh MJ, Powles SB. 2003. *ALS* gene proline (197) mutations confer *ALS* herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science*, 51(6): 831–838
- Zagnitko O, Jelenska J, Tevzadze G, Haselkorn R, Gornicki P. 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12): 6617–6622
- Zhang LL. 2018. Molecular mechanism of resistance to tribenuron-methyl in shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) from wheat fields. PhD thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [张乐乐. 2018. 麦田杂草荠菜(*Capsella bursa-pastoris*)对苯磺隆抗性分子机制的研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Zhang P. 2018. Fenoxaprop-*P*-ethyl-resistance and the control of *Lolium multiflorum* in wheat fields. PhD thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [张佩. 2018. 小麦田多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)对精噁唑禾草灵的抗药性及其治理研究. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]

(责任编辑:李美娟)