

安徽省部分地区冬小麦田日本看麦娘 *Alopecurus japonicus* 对精噁唑禾草灵的抗性发生现状及 *ACCase* 基因突变研究

赵 宁^{1,2}, 王 豪^{1,2}, 张乐乐³, 刘伟堂^{1,2}, 王金信^{*1,2}

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东省农药毒理与应用技术重点实验室, 山东 泰安 271018;
3. 山东黄河三角洲国家级自然保护区管理局, 山东 东营 257100)

摘 要: 日本看麦娘 *Alopecurus japonicus* 是中国冬小麦田和油菜田主要恶性禾本科杂草之一。为了明确安徽省部分地区日本看麦娘对精噁唑禾草灵抗性发生情况及可能存在的抗性机制, 本研究在安徽省天长市日本看麦娘发生严重区域冬小麦田共采集 10 个种群, 采用温室盆栽法在整株水平上测定了不同种群对精噁唑禾草灵的抗性水平, 扩增并比对了抗性和敏感种群之间靶标酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACCase) 基因部分序列的差异。结果显示, 与敏感种群相比, 10 个抗性种群对精噁唑禾草灵均产生了高水平抗性, 抗性指数在 30.50~58.55 之间。不同抗性种群均发生了 ACCase 基因突变, 其中 8 个种群发生了第 1 781 位异亮氨酸 (Ile) 到亮氨酸 (Leu) 突变, 2 个种群发生了第 2 027 位色氨酸 (Trp) 到半胱氨酸 (Cys) 突变。此外, 各种群均具有较高的 ACCase 基因突变频率 ($\geq 80\%$)。研究表明, 抗性日本看麦娘在安徽省部分地区发生较为严重, ACCase 基因突变是导致不同日本看麦娘种群对精噁唑禾草灵产生抗性的重要原因之一。相对于第 2 027 位, 日本看麦娘 ACCase 基因更倾向于在第 1 781 位产生突变以表现靶标抗性。

关键词: 日本看麦娘; 精噁唑禾草灵; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 靶标抗性; 基因突变

中图分类号: S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)01-0035-08

Resistance status of Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) to fenoxaprop-*p*-ethyl in multiple wheat fields in Anhui Province and involved ACCase gene mutations

ZHAO Ning^{1,2}, WANG Hao^{1,2}, ZHANG Lele³, LIU Weitang^{1,2}, WANG Jinxin^{*1,2}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China; 2. Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Tai'an 271018, Shandong Province, China; 3. Yellow River Delta National Natural Reserve Management Bureau, Dongying 257100, Shandong Province, China)

Abstract: Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) is a malignant grass weed mainly infesting winter

收稿日期: 2018-10-18; 录用日期: 2018-11-21.

基金项目: 国家自然科学基金 (31772181).

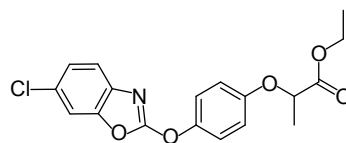
作者简介: 赵宁, 男, 博士研究生, E-mail: m15165484160@163.com; *王金信, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 教授, 主要从事除草剂毒理及其应用技术研究, E-mail: wangjx@sdau.edu.cn

wheat- and canola-growing fields in China. To determine the resistance level and the potential resistance mechanism of *A. japonicus* to fenoxaprop-*p*-ethyl, 10 populations of *A. japonicus* were collected from the wheat fields in Tianchang City, Anhui Province. Whole-plant dose-response experiments were performed to investigate the resistance levels of different populations to fenoxaprop-*p*-ethyl in the greenhouse. Partial sequences of *acetyl-CoA carboxylase* (*ACCase*) genes were subsequently amplified, sequenced, and compared between the resistant and susceptible plants. The results revealed that all 10 populations displayed high-level resistance to fenoxaprop-*p*-ethyl, and the resistance indices ranged from 30.50 to 58.55. Gene sequencing showed that the mutations of isoleucine (Ile) to leucine (Leu) at 1 781 position and tryptophan (Trp) to cysteine (Cys) at 2027 position existed in the *ACCase* genes of different populations, with eight of them had mutations at 1 781 position. Besides, all populations had mutant frequencies higher than 80%. Our results indicated that herbicide resistance has evolved to a severe stage in Anhui Province, considering that all 10 populations collected from different sites showed high-level resistance to fenoxaprop-*p*-ethyl. The Ile-1 781-Leu and Trp-2 027-Cys mutations in *ACCase* genes were very likely to be the key reasons which caused the fenoxaprop-*p*-ethyl resistance of *A. japonicus* populations. In addition, compared with 2 027 position, *ACCase* seems more prone to produce a mutation at 1 781 position in *A. japonicus*.

Keywords: *Alopecurus japonicus*; fenoxaprop-*p*-ethyl; acetyl-CoA carboxylase; target-site resistance; gene mutation

日本看麦娘 *Alopecurus japonicus* 是一种恶性禾本科杂草, 广泛分布于中国东部、中南部、西南部以及黄河流域下游沿岸^[1]。它可以适应复杂的环境条件^[2], 并逐渐发展成为稻麦轮作田和油菜田等越冬性作物田的优势杂草。日本看麦娘拥有较强的分蘖能力, 可与作物竞争水分、养分和光照, 从而严重影响作物产量。目前, 中国小麦田日本看麦娘的防治主要依赖于精噁唑禾草灵 (fenoxaprop-*p*-ethyl) 和甲基二磺隆 (mesosulfuron-methyl)。

精噁唑禾草灵 (结构式见图式 1) 是由德国赫司特 (Hoechst) 公司首先开发成功的芳氧苯氧基丙酸酯类 (Aryloxyphenoxypropionates, APPs) 除草剂, 于 20 世纪 90 年代在中国正式登记, 广泛用于冬小麦田防除禾本科杂草, 其作用靶标为乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACCase)。ACCase 类抑制剂还包括环己烯酮类 (Cyclohexanediones, CHDs) 和苯基吡唑啉类 (Phenylpyrazoline, DENs)^[3]。该类除草剂具有高效、低毒、低残留及对作物安全性高等优点, 但由于其作用位点单一, 长期大量重复使用极易导致抗药性杂草的产生。截至 2018 年 10 月, 全球已有 48 种杂草对该类除草剂产生了抗性^[4]。



图式 1 精噁唑禾草灵结构式

Scheme 1 Structural formula of fenoxaprop-*p*-ethyl

目前, 杂草对除草剂的抗性机制主要分为靶标抗性 (Target-site resistance, TSR) 和非靶标抗性 (Non-target-site resistance, NTSR)^[5]。靶标抗性主要是由于靶标酶基因突变导致酶的构象发生变化, 从而使杂草对除草剂的敏感性降低。已经证实, 禾本科杂草 ACCase 基因保守区域有 7 个氨基酸位点 (1 781、1 999、2 027、2 041、2 078、2 088 和 2 096) 可以发生 14 种氨基酸替换, 而且不同的突变形式可以对 ACCase 类抑制剂产生不同的交互抗性^[6]。Mohamed 等^[7]和 Tang 等^[8]曾报道 ACCase 基因第 1 781 位异亮氨酸 (Ile) 到亮氨酸 (Leu) 突变和第 2 041 位 Ile 到天冬酰胺 (Asn) 突变是日本看麦娘对多种 APPs 类除草剂产生靶标抗性的原因。非靶标抗性机制则较为复杂, 主要包括减少的除草剂吸收、改变的除草剂转运以及增强的除草剂代谢等^[9], 其中增强的代谢, 即代谢抗性是目前研究最多的方面^[10]。

安徽省是中国主要稻麦轮作区之一, 日本看麦娘等恶性禾本科杂草对冬小麦的生产危害十分严重。目前, 该省已发现多例日本看麦娘对精噁唑禾草灵产生了抗性。毕亚玲等^[1]在 2015 年曾报道, 采集自安徽省滁州市定远县冬小麦田的日本看麦娘种群 AH-25 对精噁唑禾草灵产生了高水平抗性, 抗性倍数为 33.82, 并于 2016 年^[2]报道采集自安徽省天长市龙集镇日本看麦娘种群 AH-15 对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆产生了多抗性。Xu 等^[3]也曾报道, 采集自安徽省合肥市肥东县冬小麦田的日本看麦娘对精噁唑禾草灵产生了高水平抗性, 抗性倍数高达 60.31。然而, 之前的研究主要集中在特定地点的特定种群, 抗性日本看麦娘在安徽省的具体发生情况尚未见报道。本

研究在安徽省日本看麦娘发生较为严重的地区采集多个日本看麦娘种群, 测定其对精噁唑禾草灵的敏感性, 扩增并比对了抗敏种群间 *ACCase* 基因序列差异, 以期进一步明确抗性日本看麦娘的发生情况及可能存在的靶标抗性机制, 旨在为抗性杂草治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 日本看麦娘种子 在安徽省滁州市天长市部分地区冬小麦田采集 10 个日本看麦娘种群, 分别标记为 AH-1~AH-10; 另外, 在天长市非耕地采集 1 个种群作为敏感对照, 标记为 AH-S。所有采集信息详见表 1。

表 1 日本看麦娘种群的地理信息

Table 1 The geographical locations of *Alopecurus japonicus* collected

种群编号 Population ID	采集地点 Sampling site	经纬度 Longitude and latitude/(°)
AH-S	天长市杨村镇周庄村 Zhouzhuang Village, Yangcun Town, Tianchang City	E118.968823, N32.789818
AH-1	天长市永丰镇蒲东村 Pudong Village, Yongfeng Town, Tianchang City	E119.045494, N32.771586
AH-2	天长市杨村镇光华村 Guanghua Village, Yangcun Town, Tianchang City	E118.940384, N32.813743
AH-3	天长市铜城镇乔田社区 Qiaotian Community, Tongcheng Town, Tianchang City	E118.937608, N32.837266
AH-4	天长市仁和集镇芦龙社区 Lulong Community, Renheji Town, Tianchang City	E119.069856, N32.643790
AH-5	天长市大通镇齐庙村 Qimiao Village, Datong Town, Tianchang City	E118.888201, N32.858278
AH-6	天长市杨村镇光华村 Guanghua Village, Yangcun Town, Tianchang City	E118.940384, N32.813745
AH-7	天长市杨村镇龙集社区 Longji Community, Yangcun Town, Tianchang City	E119.035676, N32.848171
AH-8	天长市万寿镇沙河村 Chahe Village, Wanshou Town, Tianchang City	E119.123153, N32.743880
AH-9	天长市金集镇马塘村 Matang Village, Jinji Town, Tianchang City	E118.897885, N32.899811
AH-10	天长市杨村镇季桥村 Jiqiao Village, Yangcun Town, Tianchang City	E118.985000, N32.816389

1.1.2 供试药剂与试剂 69 g/L 精噁唑禾草灵 (fenoxaprop-*p*-ethyl) 水乳剂, 拜耳作物科学 (中国) 有限公司; 2 × Es Taq MasterMix, 康为世纪生物科技有限公司; EasyPure PCR Purification Kit, 北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 供试仪器 GXZ 型智能光照培养箱, 宁波江南仪器厂; ASS-4 型自动控制农药喷洒系统, 北京盛恒天宝科技有限公司; 5427R 型高速冷冻离心机, Eppendorf 中国有限公司; T100 型梯度 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; JY300C 型电泳仪,

北京君意东方电泳设备有限公司; GA110 型万分之一天平, 德国赛多利斯公司; ChemiDoc XRS + 型凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 日本看麦娘对精噁唑禾草灵的敏感水平测定

采用温室盆栽法对各种群进行敏感性测试^[13]。选取均匀一致的日本看麦娘种子, 置于铺有 2 层滤纸 (Whatman No. 1, Maidstone, UK) 的玻璃培养皿中, 每皿添加 5 mL 无菌水以保持湿润; 将所有培养皿放入智能光照培养箱进行催芽, 设置恒温 20 °C、光照周期 12 h、相对湿度 75%。待种子

发芽后, 选取芽长 1 cm 左右的幼苗移栽到填有壤土直径为 12 cm 的塑料盆钵内, 每盆 14 株, 置于可控日光温室内进行常规培养。试验期间温室温度 15~25 °C, 自然光照, 相对湿度 75%。在 2 叶 1 心期间苗, 每盆保留长势一致的幼苗 10 株; 在 3 叶 1 心期, 采用 ASS-4 型自动控制农药喷洒系统对所有幼苗进行茎叶喷雾处理, 喷液压力设置为 0.275 MPa, 喷液量 450 L/hm²。以预试验结果为基础, 设定精噁唑禾草灵有效成分浓度梯度为: 抗性种群, 0、20.7、62.1、186.3、558.9、1 676.7 和 5 030.1 g/hm²; 敏感种群, 0、0.8、2.3、6.9、20.7、62.1 和 186.3 g/hm²。喷药后将所有幼苗放回温室继续培养。

于处理后第 21 天剪取植株地上部分, 于 75 °C 条件下烘干 72 h, 称量并记录干重。所有数据表示为相对于空白对照的干重百分比。抗性水平测定试验采用完全随机设计, 每处理设置 3 个生物学重复, 整个试验重复 2 次。使用 SPSS v19.0 (IBM, Armonk, NY, USA) 统计学软件对 2 次试验结果进行 ANOVA 分析, 由于同一处理不同试验之间不存在统计学上的显著性差异 ($P > 0.05$), 故将 2 次试验结果进行合并后, 使用 SigmaPlot v14.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) 中 4 参数非线性回归模型^[14]进行数据处理:

$$y = C + \{(D - C) / [1 + (x/GR_{50})^b]\} \quad (1)$$

式中, y 为各处理剂量下日本看麦娘干重占空白对照的百分比; C 为剂量反应下限; D 为剂量反应上限; x 为除草剂用量; GR_{50} 为抑制杂草 50% 生长量所需除草剂剂量; b 为斜率。杂草对除草剂的抗性水平用抗性指数 (Resistance index, RI) 表示, $RI = \text{抗性种群 } GR_{50} / \text{敏感种群 } GR_{50}$ 。抗性水平分级标准: $RI < 2$, 敏感; $2 \leq RI < 5$, 低抗; $5 \leq RI < 10$, 中抗; $RI \geq 10$, 高抗^[15]。

1.3 日本看麦娘 ACCase 基因抗性突变鉴定

1.3.1 基因组 DNA 提取和引物选择 从抗性、敏感日本看麦娘种群中各随机选择 30 株进行 DNA 提取。待植株生长至 3 叶 1 心期, 每株剪取 5~7 cm 长的幼嫩叶片组织, 采用经典的 CTAB 法提取 DNA^[16]。参考已报道的日本看麦娘引物进行 ACCase 基因扩增^[12], 引物序列为 ACC-F: 5'-TTTCCCA-GCGGCAGA-3' 和 ACC-R: 5'-TCCCTGGA-GTCTTGCTTTCA-3', 所扩增序列包含所有已知能够赋予日本看麦娘抗性的突变位点。所有引物

均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3.2 ACCase 基因扩增和比对 ACCase 基因 25 μL PCR 扩增体系: 2 × Es Taq MasterMix 12.5 μL、10 μmol/L 前引物 1 μL, 10 μmol/L 后引物 1 μL, 基因组 DNA 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

PCR 结束后, 取扩增产物 5 μL 于 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 切取含有目的条带的凝胶, 使用 EasyPure PCR Purification Kit 进行产物纯化后测序。所有测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

使用 DNAMAN v6.0 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 对基因序列进行比对分析。本研究中, 所有日本看麦娘 ACCase 氨基酸序列位数均参照大穗看麦娘 (*Alopecurus myosuroides* Huds.) ACCase (GenBank 登录号: AJ310767) 氨基酸序列全长进行比对。

2 结果与分析

2.1 不同日本看麦娘种群对精噁唑禾草灵的抗性水平

如表 2 所示, 日本看麦娘种群 AH-1~AH-10 均对精噁唑禾草灵产生了不同水平的抗性, GR_{50} 值在 223.89~429.78 g/hm² 之间, 远高于该药剂大田推荐剂量 62.1 g/hm²。相对于敏感种群, 各抗性种群抗性倍数在 30.50~58.55 之间, 均为高水平抗性。

2.2 不同日本看麦娘种群 ACCase 基因抗性突变鉴定

采用 PCR 扩增后得到 1 437 bp 的 ACCase 基因片段, 该片段与亲缘关系较近的大穗看麦娘对应基因的同源性为 95%。以大穗看麦娘 ACCase 基因全长氨基酸序列为基准, 将抗性和敏感日本看麦娘种群的 ACCase 基因进行比对, 结果 (表 3) 显示, AH-1~AH-10 均发生了靶标基因突变。其中, AH-1~AH-3、AH-5~AH-8 和 AH-10 ACCase 基因第 1 781 位氨基酸密码子由 ATA 突变为 TTA, 导致 Ile 突变为 Leu; AH-4 和 AH-9 ACCase 基因第 2 027 位氨基酸密码子由 TGG 突变为 TGC, 导致色氨酸 (Trp) 突变为半胱氨酸 (Cys)。各抗性种群均未发现其他位点突变, 敏感种群未发现已知位点突变。

表 2 不同日本看麦娘种群对精噁唑禾草灵的抗性水平

Table 2 Resistance levels of different *Alopecurus japonicus* populations to fenoxaprop-*p*-ethyl

种群编号 Population ID	回归方程参数 Regression parameters				GR ₅₀ /(g/hm ²)	抗性指数 Resistance index, RI
	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²		
AH-S	25.35 (2.72)	99.19 (2.58)	1.96 (0.41)	0.994 8	7.34 (0.80)	1.00
AH-1	24.72 (1.25)	98.49 (1.03)	2.57 (0.25)	0.998 9	256.67 (12.05)	34.97
AH-2	26.84 (1.12)	98.77 (0.92)	2.72 (0.24)	0.999 1	267.04 (11.67)	36.38
AH-3	25.80 (2.32)	96.37 (1.94)	2.71 (0.59)	0.995 9	239.23 (21.08)	32.59
AH-4	24.19 (3.00)	97.16 (1.82)	1.61 (0.25)	0.996 5	429.78 (46.10)	58.55
AH-5	28.67 (2.62)	96.46 (1.99)	2.15 (0.38)	0.995 0	345.70 (37.02)	47.10
AH-6	26.16 (1.97)	97.18 (1.54)	2.43 (0.31)	0.997 2	327.07 (25.28)	44.56
AH-7	24.23 (1.70)	97.48 (1.38)	2.38 (0.28)	0.998 0	274.95 (17.96)	37.46
AH-8	26.84 (1.66)	97.41 (1.43)	2.73 (0.48)	0.997 8	223.89 (13.54)	30.50
AH-9	26.35 (2.56)	96.94 (2.03)	2.79 (0.48)	0.995 1	340.05 (34.47)	46.33
AH-10	27.31 (1.67)	97.50 (1.38)	2.46 (0.33)	0.997 9	250.76 (16.40)	34.16

注: 括号内数据为标准误差。

Note: Standard errors (SE) are in parentheses.

表 3 不同日本看麦娘种群 *ACCase* 基因部分序列Table 3 Partial sequences of *ACCase* genes from different *Alopecurus japonicus* populations

种群 Population	各氨基酸的位置和碱基及相应氨基酸序列 The amino acid position, relative sequence of nucleotide and derived amino acids											
	1 780	1 781	1 782	1 998	1 999	2 000	2 026	2 027	2 028	2 040	2 041	2 042
大穗看麦娘 <i>A. myosuroides</i>	AAC	ATA	CAT	GTT	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	Ile	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-S	AAC	ATA	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	Ile	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-1	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-2	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-3	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-4	AAC	ATA	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	<u>TGC</u>	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	Ile	His	Val	Trp	Phe	Asn	<u>Cys</u>	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-5	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-6	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-7	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-8	AAC	TTA	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	Leu	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-9	AAC	ATA	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	<u>TGC</u>	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	Ile	His	Val	Trp	Phe	Asn	<u>Cys</u>	Arg	Gly	Ile	Leu
AH-10	AAC	<u>TTA</u>	CAT	GTC	TGG	TTT	AAC	TGG	AGA	GGA	ATT	CTG
	Asn	<u>Leu</u>	His	Val	Trp	Phe	Asn	Trp	Arg	Gly	Ile	Leu

续表 3
Table 3 (Continued)

种群 Population	各氨基酸的位置和碱基及相应氨基酸序列 The amino acid position, relative sequence of nucleotide and derived amino acids								
	2 077	2 078	2 079	2 087	2 088	2 089	2 095	2 096	2 097
大穗看麦娘 <i>A. myosuroides</i>	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-S	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-1	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-2	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-3	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-4	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-5	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-6	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-7	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-8	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-9	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn
AH-10	ATT	GAT	AGC	GAG	TGC	TAT	AAG	GGT	AAT
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn

注：粗体表示 *ACCase* 基因已知可以发生氨基酸突变的位点；下划线表示该种群该位点发生氨基酸替换。

Note: All known mutation sites in *ACCase* are shown in bold. Amino acid substitutions in specific sites are underlined.

2.3 不同抗性日本看麦娘种群 *ACCase* 基因突变频率

对日本看麦娘种群 30 个单株测序结果进行分析，得到不同种群的 *ACCase* 基因突变频率（表 4）。所有抗性种群靶标基因突变频率均 $\geq 80\%$ ，其中 AH-5 和 AH-10 突变频率最高，达 100%；AH-6 突变频率最低，为 80%。

3 结论与讨论

近 20 年来，由于精噁唑禾草灵较高的选择性和极佳的除草活性，已被广泛应用于小麦田防除禾本科杂草，也因此导致了杂草抗性的快速产生^[17]。本研究所采集的 10 个日本看麦娘种群均对精噁唑禾草灵产生了高水平抗性 ($RI \geq 10$)，抗性水平最高达 58.55 倍。日本看麦娘对精噁唑禾草灵高水平抗性发生情况可能与当地的用药历史有关。据报

表 4 不同抗性日本看麦娘种群

Table 4 Mutant frequencies of *ACCase* in different *Alopecurus japonicus* populations

种群编号 Population ID	突变型植株数量 Mutant type	野生型植株数量 Wild type	突变频率 Mutant frequency/%
AH-1	26	4	87
AH-2	27	3	90
AH-3	29	1	97
AH-4	28	2	93
AH-5	30	0	100
AH-6	24	6	80
AH-7	29	1	97
AH-8	26	4	87
AH-9	27	3	90
AH-10	30	0	100

道，*ACCase* 抑制剂连续使用不超过 10 次就会导致抗性杂草的产生^[15]，而该地区已经连续使用精

噁唑禾草灵防治小麦田禾本科杂草超过 15 a。日本看麦娘是四倍体植株^[18], 可异花授粉^[2], 抗性基因很容易通过花粉进行传播, 这可能是不同种群均具有较高靶标基因突变频率的主要原因。

本研究中, 10 个日本看麦娘种群共发生了 2 种 ACCase 基因突变, 即 Ile-1781-Leu 和 Trp-2027-Cys, 其中第 1 781 位突变发生比例高达 80%。基因突变是导致杂草对除草剂产生靶标抗性的主要原因之一^[5]。目前, Ile-1781-Leu 已在多种杂草中证实可以对精噁唑禾草灵表达抗性, 包括大穗看麦娘^[19], 野燕麦 *Avena fatua*^[20] 和瑞士黑麦草 *Lolium rigidum*^[21] 等。Délye 等^[22] 报道, Trp-2027-Cys 突变是大穗看麦娘对 ACCase 抑制剂产生抗性的原因。因此, ACCase 基因第 1781 位和第 2027 位突变很可能与这些种群对精噁唑禾草灵的抗性有关。Vila-Aiub 等^[23] 研究了 Ile-1781-Leu 突变对 ACCase 活性的影响, 发现该突变对靶标酶动力学无多效性影响, 这可能是该突变形式发生频率较高的主要原因之一。

不同的靶标酶基因突变会导致杂草对除草剂产生不同的交互抗性。Délye 等^[22] 报道, ACCase 基因 Ile-1781-Leu 发生突变的大穗看麦娘可以对精噁唑禾草灵、炔草酯、氟吡甲和灵和噁草酮同时产生抗性, 而 Trp-2027-Cys 突变则不能对烯草酮和噁草酮产生抗性。Du 等^[24] 证明, ACCase 基因 Ile-1781-Leu 突变可以赋予茵草 *Beckmannia syzigachne* 对 APPs、CHDs 和噁草酯产生高水平抗性, 对精吡氟氯禾灵产生中等水平的抗性; 而 Trp-2027-Cys 突变可对 APPs 和噁草酯产生高水平抗性, 对 CHDs 产生低水平抗性。本研究仅测试了抗性日本看麦娘种群对精噁唑禾草灵的抗性水平, 而这些种群是否对其他类型的 ACCase 抑制剂也表现出抗性则有待进一步研究。

现已证明, 非靶标抗性是禾本科杂草对 ACCase 抑制剂产生抗性的主要机制^[25]。Neve 等^[26] 报道, 长期施用单一除草剂会促进杂草体内非靶标抗性基因的积累。本研究中, 10 个日本看麦娘种群具有较长的精噁唑禾草灵单一使用历史 (>15 a), 因此种群抗性中非靶标抗性参与的可能性较高。本研究仅从靶标抗性方面鉴定了不同抗性种群的靶标酶基因突变, 而其抗性中是否存在非靶标抗性则需要采用细胞色素 P450 单加氧酶酶活体抑制或除草剂代谢速率测定等试验进一步测定^[17,27-28]。

杂草抗性的产生与麦田不合理应用化学除草剂存在很大关系。在实际农业生产中, 随意提高应用剂量, 或在一个生产季度内多次施用同类药剂, 是加快抗性种群产生的主要原因^[29]。日本看麦娘抗性的快速发展对田间杂草的综合治理提出了更高的要求。据 Wang 等^[30] 报道, 日本看麦娘种子在土壤埋藏深度为 0~4 cm 时适宜萌发, 在 7 cm 时出苗则被完全抑制。因此, 合理选择并轮用、混用不同作用机制的除草剂, 把药剂防治与作物轮作 (如小麦和油菜轮作)、深耕等农业措施相结合^[31], 是延缓日本看麦娘抗性进一步发生发展的有效手段。

参考文献 (Reference):

- [1] XU H L, ZHU X D, WANG H C, et al. Mechanism of resistance to fenoxaprop in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) from China[J]. Pestic Biochem Physiol, 2013, 107(1): 25-31.
- [2] WU X B, ZHANG T, PAN L, et al. Germination requirements differ between fenoxaprop-*p*-ethyl resistant and susceptible Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) biotypes[J]. Weed Sci, 2016, 64(4): 653-663.
- [3] HERBERT D, WALKER K A, PRICE L J, et al. Acetyl-CoA carboxylase-a graminicide target site[J]. Pest Manag Sci, 1997, 50(1): 67-71.
- [4] HEAP I M. The international survey of herbicide resistant weeds[DB/OL]. [2018-10-17]. <http://www.weedscience.org>.
- [5] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 317-347.
- [6] KAUNDUN S S. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides[J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(9): 1405-1417.
- [7] MOHAMED I A, LI R Z, YOU Z G, et al. Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) resistance to fenoxaprop and pinoxaden in China[J]. Weed Sci, 2012, 60(2): 167-171.
- [8] TANG H W, LI J, DONG L Y, et al. Molecular bases for resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitor in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) [J]. Pest Manag Sci, 2012, 68(9): 1241-1247.
- [9] YUAN J S, TRANEL P J, STEWART C N JR. Non-target-site herbicide resistance: a family business[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(1): 6-13.
- [10] GHANIZADEH H, HARRINGTON K C. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides[J]. Crit Rev Plant Sci, 2017, 36(1): 24-34.
- [11] 毕亚玲, 吴翠霞, 郭文磊, 等. 抗精噁唑禾草灵的日本看麦娘 ACCase 基因突变[J]. 植物保护学报, 2015, 42(3): 447-452. BI Y L, WU C X, GUO W L, et al. Mutation in the acetyl-CoA carboxylase confers resistance to fenoxaprop-*p*-ethyl in *Alopecurus japonicus* populations[J]. J Plant Prot, 2015, 42(3): 447-452.

- [12] BI Y L, LIU W T, GUO W L, et al. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-and ALS-inhibiting herbicides in *Alopecurus japonicus* from China[J]. Pestic Biochem Physiol, 2016, 126: 22-27.
- [13] 赵宁, 郭文磊, 李伟, 等. 抗精噁唑禾草灵和甲基二磺隆看麦娘 ACCase 和 ALS 基因突变[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 833-840.
- ZHAO N, GUO W L, LI W, et al. Mutations in the acetyl-CoA carboxylase and acetolactate synthase confer resistance to fenoxaprop-*P*-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis* populations[J]. J Plant Prot, 2017, 44(5): 833-840.
- [14] SEEFELDT S S, JENSEN J E, FUERST E P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships[J]. Weed Technol, 1995, 9(2): 218-227.
- [15] BECKIE H J, TARDIF F J. Herbicide cross resistance in weeds[J]. Crop Prot, 2012, 35: 15-28.
- [16] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15(1): 8-15.
- [17] ZHAO N, YAN Y Y, GE L A, et al. Target site mutations and cytochrome P450s confer resistance to fenoxaprop-*p*-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis*[J]. Pest Manag Sci, 2019, 75(1): 204-214.
- [18] XU H L, ZHANG W P, ZHANG T, et al. Determination of ploidy level and isolation of genes encoding acetyl-CoA carboxylase in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*)[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114712.
- [19] PETIT C, BAY G, PERNIN F, et al. Prevalence of cross-or multiple resistance to the acetyl-Coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France[J]. Pest Manag Sci, 2010, 66(2): 168-177.
- [20] YU Q, AHMAD-HAMDANI M S, HAN H P, et al. Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species[J]. Heredity, 2013, 110(3): 220-231.
- [21] ZHANG X Q, POWLES S B. Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population[J]. New Phytol, 2006, 172(4): 636-645.
- [22] DÉLYE C, MATÉJICEK A, MICHEL S. Cross-resistance patterns to ACCase-inhibiting herbicides conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds.(black-grass), re-examined at the recommended herbicide field rate[J]. Pest Manag Sci, 2008, 64(11): 1179-1186.
- [23] VILA-AIUB M M, YU Q, HAN H P, et al. Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*[J]. J Exp Bot, 2015, 66(15): 4711-4718.
- [24] DU L, LIU W T, YUAN G H, et al. Cross-resistance patterns to ACCase-inhibitors in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.) homozygous for specific ACCase mutations[J]. Pestic Biochem Physiol, 2016, 126: 42-48.
- [25] HAWKINS N J, BASS C, DIXON A, et al. The evolutionary origins of pesticide resistance[J]. Biol Rev, 2018.
- [26] NEVE P, VILA-AIUB M, ROUX F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management[J]. New Phytol, 2009, 184(4): 783-793.
- [27] ZHAO N, LI W, BAI S, et al. Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1391.
- [28] HAN H P, YU Q, CAWTHRAY G R, et al. Enhanced herbicide metabolism induced by 2, 4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl[J]. Pest Manag Sci, 2013, 69(9): 996-1000.
- [29] XU H L, LI J, ZHANG D, et al. Mutations at codon position 1999 of acetyl-CoA carboxylase confer resistance to ACCase-inhibiting herbicides in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*)[J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(12): 1894-1901.
- [30] WANG H Z, HUANG Y Z, ZHANG L L, et al. Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) management in wheat in China: seed germination, seedling emergence, and response to herbicide treatments[J]. Weed Technol, 2018, 32(2): 211-220.
- [31] ZHAO N, LI Q, GUO W L, et al. Effect of environmental factors on germination and emergence of shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis*)[J]. Weed Sci, 2018, 66(1): 47-56.

(责任编辑: 金淑惠)