

黄启超,顾琼楠,褚世海,等. 稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的靶标抗性机制[J]. 江苏农业科学,2022,50(19):104 - 110.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.19.016

稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的靶标抗性机制

黄启超^{1,2}, 顾琼楠², 褚世海², 陈安安², 李 林², 李儒海², 孙正祥¹

(1. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; 2. 湖北省农业科学院植保土肥研究所/

农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室, 湖北武汉 430064)

摘要:为明确稗(*Echinochloa crus-galli*) 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的靶标抗性机制,采用整株生物测定法,以敏感稗 18 - NJ 作为对照,明确稗 18 - WJJ - Ec 种群的抗性指数(RI),通过分子生物学方法测定分析了稗乙酰乳酸合成酶(ALS)基因序列及表达量,并测定稗 ALS 离体活性。结果表明,五氟磺草胺对稗 18 - WJJ - Ec 种群的鲜质量抑制中浓度(ED₅₀)为 20.54 g a. i./hm²,是敏感稗 18 - NJ 种群 RI 的 42.79 倍;稗 18 - WJJ - Ec 的 ALS 氨基酸基因序列 574 位色氨酸(Trp)突变成了亮氨酸(Leu);ALS 离体活性显著高于敏感稗 18 - NJ;五氟磺草胺处理 1 d 后,稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 基因表达量极显著高于敏感稗 18 - NJ 种群,ALS 基因表达量是对照的 8.72 倍,总体结果表明稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺存在靶标抗性机制。

关键词:稗;五氟磺草胺;乙酰乳酸合成酶;抗性水平;靶标抗性机制

中图分类号:S451.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)19-0104-06

稗属(*Echinochloa* Beauv.) 杂草是我国稻田恶性杂草之一,严重制约了我国水稻产量^[1-3]。目前,针对稻田稗属杂草主要以化学防治为主,国内用于防治稻田稗属杂草的除草剂主要有五氟磺草胺、乙草胺、丁草胺、丙草胺、二氯喹啉酸、双草醚、氰氟草酯等,其中三唑并嘧啶磺酰胺类的五氟磺草胺是目前较常用的除稗剂。五氟磺草胺是乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂,由美国陶氏益农公司研发,于 2008 年进入我国市场,因其良好的除稗草效果而得到广泛推广使用。近年来,由于五氟磺草胺的长期单一使用导致多地稗草对其产生抗性,其中以湖北省稗草高水平抗性比例最高^[4]。2018 年,马国兰等对我国 7 省共 70 个地区的稻田稗属杂草进行了五

氟磺草胺抗性检测,结果表明 50% 地区稗属杂草对五氟磺草胺达到了高抗水平,47.1% 地区稗属杂草对五氟磺草胺达到了中抗水平,抵抗水平稗属杂草地区只有 2.9%,所有地区均无敏感稗属种群;其中,湖北、安徽、宁夏和黑龙江等 4 个省份的高水平抗性稗属种群发生情况最为严重^[5]。

杂草抗性机制主要包括靶标抗性机制和非靶标抗性机制^[6],靶标抗性机制一般与相关靶标基因突变或过量表达有关,靶标基因的突变造成相关靶标蛋白 3D 结构或者电化学性质改变,导致靶标酶与除草剂亲和力降低,而靶标基因过量表达导致靶标酶含量提高,从而补偿除草剂的抑制^[7];非靶标抗性的作用机制主要包括杂草对除草剂的解毒代谢增强、渗透减弱、吸收减少、传导变缓及屏蔽作用等^[8]。目前已报道的杂草 ALS 抗性突变位点有 9 个,其中已报道的稗属杂草 ALS 氨基酸序列抗性突变位点有 Ala-122、Pro-197、Ala-205、Phe-206、Asp-376 和 Trp-574 等,这 6 个位点的突变均使得稗属杂草对 ALS 抑制剂类除草剂产生了抗性。例如, Fang 等发现稗(*Echinochloa crus-galli*) Ala-122-Val 和 Ala-205-Gly 等 2 种靶标位点突变生物型均对五氟磺草胺产生了抗性,且 2 个突变型稗 ALS 离体活性均高于敏感种群^[9]。此外, Fang 等还

收稿日期:2022-05-19

基金项目:湖北省农业科学院领军人才培养计划(编号:L2018012);湖北省农业科学院青年基金(编号:2020NKYJJ09);湖北省农业科技创新中心创新团队项目(编号:2021-620-000-001-13);湖北省农业科学院植保土肥研究所青年基金(编号:2021ZTSQJ04)。

作者简介:黄启超(1991—),男,湖北随州人,硕士,主要从事杂草抗药性和杂草生物防治研究。E-mail:qichao.huang@foxmail.com。
通信作者:孙正祥,博士,副教授,主要从事植物病害生物防治研究, E-mail:sunzhengxiang9904@126.com;李儒海,博士,研究员,主要从事杂草生物生态学及综合治理研究, E-mail:ruhaili73@163.com。

发现了抗五氟磺草胺稗 ALS 氨基酸序列 Phe - 206 - Leu 突变型,且该突变位点是 1 处新的 ALS 突变位点^[10]。Yang 等在研究稗对五氟磺草胺和氰氟草酯的抗性机制中发现,稗 Trp - 574 - Leu 突变生物型对五氟磺草胺的抗性指数为 65.84 倍^[11]。Liu 等发现了水稻 (*Echinochloa phyllopogon*) ALS2 氨基酸序列拷贝 Pro - 197 - Ser 突变型,且该突变型水稻对部分 ALS 抑制剂产生了交互抗性,同时 ALS 离体活性比敏感种群高 13.7 倍^[12]。此外,2021 年, Löbmann 等首次发现并报道了稗 ALS 氨基酸序列中 376 位天门冬氨酸 (Asp) 突变成了谷氨酸 (Glu)^[13]。Dalazen 等在研究咪唑乙烟酸对稗降解增强相关基因差异表达的影响中发现,抗咪唑乙烟酸稗生物型细胞色素 P450 酶和谷胱甘肽 S 转移酶相关基因表达量均高于敏感种群,但 ALS 基因表达量与敏感种群差异不显著,可能由非靶标抗性机制主导^[14]。

关于湖北省稗种群对五氟磺草胺靶标抗性机制的研究鲜有报道,目前仅在湖北省荆州市公安县发现 ALS 氨基酸序列 Trp - 574 - Leu 突变型稗^[15]。本研究拟通过测定稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的敏感性及其抗性机制,明确稗 18 - WJJ - Ec 种群的抗性水平及靶标抗性机制,以期为湖北省稻田抗性稗的防除治理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物:抗性稗于 2018 年 9 月采自湖北省武汉市江夏区金水试验农场水稻田;敏感型稗 18 - NJ 种子由江苏省农业科学院植物保护研究所李永丰课题组提供。

供试药剂和试剂主要有 25 g/L 五氟磺草胺乳油[陶氏益农农业科技(江苏)有限公司]、97.1% 五氟磺草胺原药(安徽星宇化工有限公司)、焦磷酸硫胺素 (TPP,北京索莱宝科技有限公司)、黄素腺嘌呤二核苷酸钠盐 (FAD,上海麦克林生化科技有限公司)、1 - 萘酚(上海麦克林生化科技有限公司)、肌酸(国药集团化学试剂有限公司)、乙偶姻(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、NuClean Plant Genomic DNA Kit(江苏康为世纪生物科技有限公司)、Cycle - Pure Kit(美国 Omega Bio - Tek 公司); TR251 - 50 小量 RNA 提取试剂盒(北京天漠科技开发有限公司)、iTAPTM Universal SYBR® Green Supermix(美国 Bio - Rad Laboratories 公司)、5 ×

All - In - One MasterMix(加拿大 Applied Biological Materials Inc 公司)、Zero Background pTOPO - TA(北京艾德莱生物科技有限公司)、Trans 5α Chemically Competent Cell(上海唯地生物技术有限公司)、Phanta® Max Super - Fidelity DNA Polymerase(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

仪器设备主要有 Optima XPN - 100 超高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司)、东胜 ETC811 PCR 扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司)、Eppendorf Centrifuge 5810R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、Bio - rad CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio - Rad 公司)、Biotek Epoch 酶标仪(美国 Biotek 公司)、LAC - 400 - N 人工气候箱(上海龙跃仪器设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 剂量反应曲线测定 参照 NY/T 1155.4—2006 农药室内生物测定试验准则,将抗性稗 18 - WJJ - Ec 种群和敏感稗 18 - NJ 种群种子浸泡在 100 mg/L 赤霉酸溶液中,并于 27 °C 光照培养箱中催芽 24 h,然后分别播种在直径 15 cm 塑料盆(含 4/5 基质土)中,每盆 50 粒,均匀覆土 1 cm,置于温室内培养,培养条件为白天温度 (27 ± 5) °C,夜间温度 (20 ± 5) °C,相对湿度 (75 ± 5) %,自然光培养。稗 2 ~ 3 叶时期时,每盆保留长势一致植株 20 株,待稗 3 叶 1 心时期,对抗性稗 18 - WJJ - Ec 种群茎叶喷施 4、8、16、32、64、128、256、512 g a. i./hm² 共 8 个浓度的五氟磺草胺,敏感稗 18 - NJ 种群茎叶喷施五氟磺草胺浓度梯度为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 g a. i./hm²,以清水处理作为对照,每个处理 4 个重复,施药 21 d 后测量每盆稗地上部分鲜质量。

1.2.2 稗 ALS 基因序列测定 将稗 18 - WJJ - Ec 种群和 18 - NJ 种群种子分别播种在 10 cm × 10 cm × 10 cm 的塑料方盒中,于 28 °C,光暗 1 : 1,3 000 lx 人工气候箱中培养至 3 叶 1 心期,以五氟磺草胺田间推荐剂量高量 30 g a. i./hm² 茎叶喷施处理稗 18 - WJJ - Ec 种群,稗 18 - NJ 种群不处理,14 d 后取存活稗幼嫩组织,采用 NuClean Plant Genomic DNA Kit 提取稗总 DNA,每个种群提取 10 棵稗单株总 DNA。根据 NCBI 登录的稗 ALS 基因序列,采用 Primer Premier 5.0 设计稗 ALS 基因全长扩增引物序列(上游引物:5' - GTCATCGCCAACCACCTCTTCC - 3',下游引物:5' - CTGCCATCACCATCCAGGATC - 3')。PCR 反应体系:DNA 模板 1 μL;2 × Phanta Max

Buffer 12.5 μL ; dNTP Mix 0.5 μL ; Phanta Max Super – Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL ; dd H_2O 补足至 25 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳鉴定后, 用 Cycle – Pure Kit (Omega Bio – Tek 公司) 进行产物纯化回收, 回收产物经过连接、转化、克隆至 pTOPO Vector, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h 后, 每个 DNA 样本挑取 10 个单克隆菌株培养扩繁, 新鲜菌液经 PCR 扩增及凝胶电泳鉴定后送至湖北武汉擎科生物科技有限公司进行双向测序拼接。所测序列结果经 BLAST 比对验证后, 用 DNAMAN6.0 软件进行比对分析。

1.2.3 稗 ALS 活性测定 采用 Yu 等的方法^[16] 进行测定, 按“1.2.2”节方法培养稗至 3 叶 1 心期, 每个种群取幼嫩叶片 3.0 g, 液氮下研磨成细粉, 准确称量 2.0 g 细粉转入离心管中, 加入 16 mL 酶提取液 (含 10 mmol/L 丙酮酸钠, 0.5 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L TPP, 10 $\mu\text{mol/L}$ FAD 的 0.1 mol/L pH 值为 7.5 的磷酸缓冲液), 混匀后冰上放置 10 min, 用 2 层尼龙网纱布过滤, 滤液于 27 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 20 min, 将上清液转入新离心管中, 缓慢加入硫酸铵晶体 (每 1 mL 粗酶液加 0.313 g 硫酸铵晶体), 缓慢搅拌 20 min, 于 27 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 20 min, 弃上清液, 沉淀加入 4.5 mL 酶反应液 (含 200 mmol/L 丙酮酸钠, 20 mmol/L MgCl_2 , 2 mmol/L TPP, 20 $\mu\text{mol/L}$ FAD 的 0.05 mol/L pH 值为 7.5 的磷酸缓冲液) 充分溶解得到粗酶液, 并置于冰上备用。于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 100 μL 上述粗酶液和 100 μL 以 0.05 mol/L pH 值 7.5 磷酸缓冲液配制的五氟磺草胺溶液 (浓度梯度为 0.01、0.10、1.00、10.00、100.00、1 000.00 $\mu\text{mol/L}$), 充分混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴暗反应 1 h, 加入 8 μL 6 mol/L H_2SO_4 , 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴脱羧 15 min 终止反应, 然后加入 5.5% 1 – 萘酚 (以 2.5 mol/L NaOH 配制) 和 0.55% 肌酸各 190 μL , 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴显色 15 min, 冰浴 1 min 后低速离心, 取 200 μL 上清液加入 96 孔酶标板中, 测定 $D_{530\text{nm}}$ 值, 以 100 μL 磷酸缓冲液代替五氟磺草胺作为空白对照, 以提前加入 8 μL 6 mol/L H_2SO_4 的酶液作为背景对照。试验生物学重复 2 次, 技术重复 3 次。以乙偶姻制作标准曲线, 将反应液 $D_{530\text{nm}}$ 值换算成乙偶姻含量, 计算五氟磺草胺对各种种群稗离体 ALS 抑制中浓度 (ED_{50}), 并计算抗性指数 (RI)。

1.2.4 稗 ALS 基因表达量测定 按“1.2.2”节方法培养稗至 3 叶 1 心期, 以五氟磺草胺田间推荐剂量低剂量 15 g a. i. / hm^2 茎叶喷雾处理, 采用 TRIZOL 法, 用 TR251 – 50 小量 RNA 提取试剂盒提取施药前和施药后 1、3、5、7 d 稗单株总 RNA, 用 5 \times All – In – One RT Master Mix 反转录成 cDNA 后, 采用 Bio – rad CFX Connect 荧光定量 PCR 仪进行稗 ALS 基因相对表达量测定, 以稗 ALS 基因为模板设计 RT – qPCR 扩增引物 (上游引物 QALS – F; 5' – ATCCGCATTGAGAACCTCC – 3', 下游引物 QALS – R; 5' – TCTTCTTGATTGCTGCACGT – 3'), 以肌动蛋白 Actin 作为内参基因 (上游引物 ACT – F; 5' – CACACTGGTGTCTATGGTAGG – 3', 下游引物 ACT – R; 5' – AGAAAGTGTGATGCCAGAT – 3'), 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法以敏感稗 18 – NJ 种群未用药处理组作为对照组, 分析计算稗 ALS 基因相对表达量, 试验生物学重复 2 次, 技术重复 3 次。

1.3 数据处理

所有数据经 Excel 处理后, 采用 SigmaPlot 14.0 软件 Logistic 模型计算五氟磺草胺对各种种群抑制中浓度 (ED_{50}), 拟合方程如式 (1):

$$Y = C + \frac{D - C}{1 + (x + \text{ED}_{50})^b} \quad (1)$$

式中: x 表示除草剂剂量; Y 为药剂处理与空白对照百分比; b 为斜率; C 为剂量反应下限; D 为剂量反应上限。

抗性指数 RI 按公式 (2) 计算:

$$RI = \frac{RED_{50}}{SED_{50}} \quad (2)$$

式中: RI 为抗性指数; RED_{50} 为抗性生物型的抑制中浓度; SED_{50} 为敏感生物型的抑制中浓度。

抗性水平分级标准^[17]: 敏感: $RI \leq 2$; 低抗: $2 < RI \leq 6$; 中抗: $6 < RI \leq 12$; 高抗: $12 < RI$ 。

2 结果与分析

2.1 剂量反应曲线测定

试验结果表明, 五氟磺草胺对稗 18 – WJJ – Ec 种群的抑制中浓度为 20.54 g a. i. / hm^2 , 对 18 – NJ 的抑制中浓度为 0.48 g a. i. / hm^2 , 抗性稗 18 – WJJ – Ec 种群相对敏感稗 18 – NJ 种群的抗性指数达到 42.79 倍, 属于高抗水平 (表 1、图 1)。

2.2 稗 ALS 基因序列测定

通过 BLAST 对稗 ALS 基因序列与 GenBank 收录

表 1 稗对五氟磺草胺的敏感性

种群	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>b</i>	ED ₅₀ (g a.i./hm ²)	相关系数	抗性指数
18 - WJJ - Ec	100.094 3	-5.856 2	-0.753 6	20.54	0.996 1	42.79
18 - NJ	100.053 8	-2.504 3	-1.026 0	0.48	0.991 3	1.00

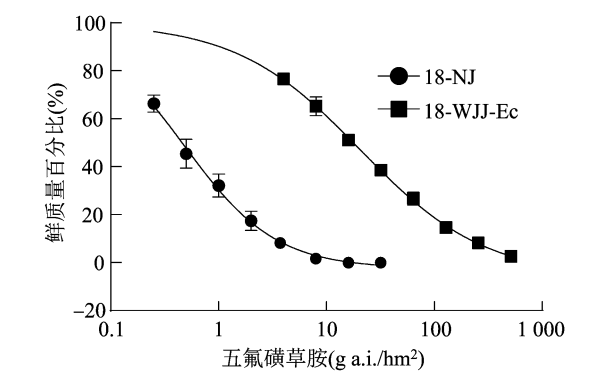


图1 稗对五氟磺草胺的剂量反应曲线

的稗 *ALS* 基因不同拷贝序列(登录号: *ALS1*: KY071206.1; *ALS2*: KY071207.1; *ALS3*: KY071208.1) 进行比对,相似度均在 99% 以上,扩增所得 *ALS* 基因序列全部是稗 *ALS* 基因序列。通过 DNAMAN6.0 软件将稗 18 - NJ 种群各单株 *ALS* 基因序列不同拷贝(18 - NJ - *ALS1*、18 - NJ - *ALS2*、18 - NJ - *ALS3*) 翻译成氨基酸后,与 GenBank 收录的敏感稗 *ALS* 氨基酸序列对应拷贝进行比对,未发现氨基酸位点突变。然后将抗五氟磺草胺稗 18 - WJJ - Ec 种群各

单株 *ALS* 基因不同拷贝序列(18 - WJJ - Ec - *ALS1*、18 - WJJ - Ec - *ALS2*、18 - WJJ - Ec - *ALS3*) 翻译成氨基酸后,与敏感稗 18 - NJ 种群对应 *ALS* 氨基酸序列拷贝进行比对,发现 1 处已报道过的氨基酸突变位点,稗 18 - WJJ - Ec 种群的 *ALS* 氨基酸序列 574 位(以拟南芥 *ALS* 氨基酸序列编号为模板)密码子由 TGG 突变成了 TTG,所编码的氨基酸由色氨酸(Trp)突变成了亮氨酸(Leu),且在稗 18 - WJJ - Ec 种群 *ALS* 氨基酸序列的不同拷贝上均发现 Trp - 574 - Leu 突变位点(图 2)。此外,稗 18 - WJJ - Ec 种群 *ALS* 氨基酸 Trp - 574 - Leu 突变主要发生在稗 *ALS2* 基因序列拷贝上,稗 *ALS2* 基因序列发生 Trp - 574 - Leu 突变频率为 87.50%,而 *ALS1* 和 *ALS3* 基因序列拷贝发生 Trp - 574 - Leu 突变频率分别为 5.88%、8.57%,结果表明稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的抗性是由靶标位点突变引起的。

2.3 稗 *ALS* 活性测定

根据乙偶姻浓度梯度以及对应的 *D*_{530 nm} 吸光度,计算出乙偶姻的标准曲线(图 3),线性拟合较

	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579
18-NJ-ALS1	C T G G G T A T G G T G G T G C A G	T G G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	W	E D R F Y									
18-WJJ-Ec-ALS1	C T G G G T A T G G T G G T G C A G	T T G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	L	E D R F Y									
18-NJ-ALS2	C T G G G G A T G G T G G T G C A G	T G G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	W	E D R F Y									
18-WJJ-Ec-ALS2	C T G G G G A T G G T G G T G C A G	T T G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	L	E D R F Y									
18-NJ-ALS3	C T T G G G A T G G T G G T G C A G	T G G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	W	E D R F Y									
18-WJJ-Ec-ALS3	C T T G G G A T G G T G G T G C A G	T T G	G A G G A C A G A T T C T A C									
	L G M V V Q	L	E D R F Y									

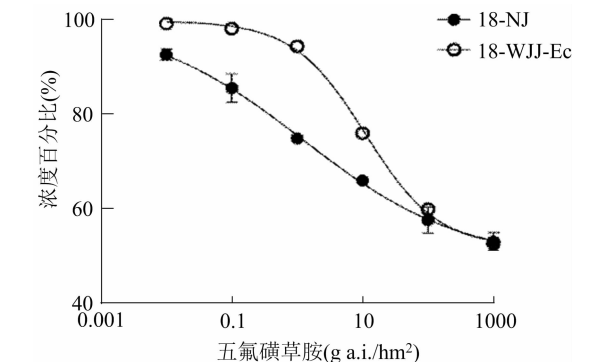
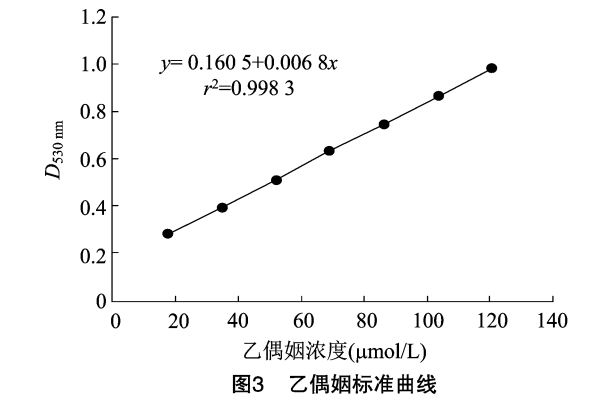
图2 稗 18-WJJ-Ec 及 18-NJ 种群部分 *ALS* 核苷酸及对应氨基酸序列比对

好,可以将稗离体 ALS 活性吸光度换算成乙偶姻浓度,然后计算出五氟磺草胺对稗离体 ALS 的抑制中浓度。结果表明,在离体条件下,未用五氟磺草胺处理前,抗五氟磺草胺稗 18 - WJJ - Ec 种群的 ALS 浓度(乙偶姻生成量)为 32.82 $\mu\text{mol/L}$,而敏感稗 18 - NJ 种群的 ALS 浓度为 19.83 $\mu\text{mol/L}$,稗 18 - WJJ - Ec 种群的 ALS 浓度明显高于敏感稗 18 - NJ 种群。五氟磺草胺对抗性稗 18 - WJJ - Ec 种群离

体 ALS 的抑制中浓度(ED_{50})为 11.09 $\mu\text{mol/L}$,对敏感稗 18 - NJ 种群离体 ALS 的抑制中浓度为 1.24 $\mu\text{mol/L}$,稗 18 - WJJ - Ec 种群相对敏感稗 18 - NJ 种群的抗性指数为 8.28 倍(表 2、图 4),表明稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 含量高于稗 18 - NJ 种群,且离体 ALS 对五氟磺草胺的敏感性降低,靶标酶浓度及活性的增加参与了稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺的抗性机制。

表 2 五氟磺草胺对稗离体 ALS 的抑制中浓度

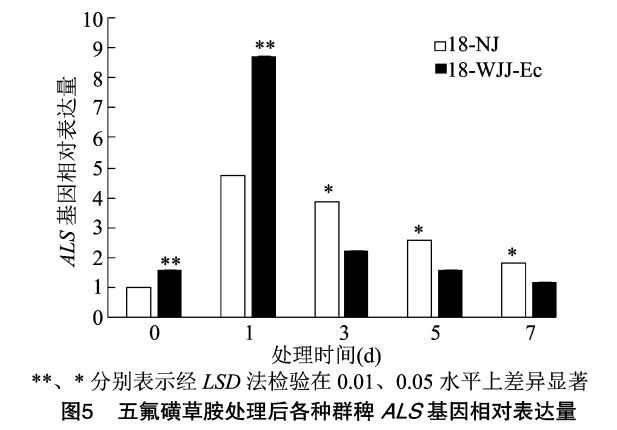
种群	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>b</i>	ED_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	相关系数	抗性指数
18 - WJJ - Ec	99.689 5	51.751 0	-0.785 2	11.09	0.998 3	8.28
18 - NJ	100.099 4	48.877 7	-0.359 0	1.24	0.991 2	1.00



2.4 稗 ALS 基因表达量测定

通过 RT - qPCR 荧光定量反应,用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法以敏感稗 18 - NJ 种群未用药处理组作为对照组计算分析各种群稗 ALS 基因相对表达量,结果表明,经五氟磺草胺处理后,稗 18 - WJJ - Ec 和 18 - NJ 种群的 ALS 基因表达量均呈先升高后降低趋势。药剂处理前,稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 基因表达量是敏感稗 18 - NJ 种群的 1.58 倍,ALS 基因表达量极显著高于 18 - NJ 种群。药剂处理 1 d 后,稗 18 - WJJ -

Ec 和 18 - NJ 种群 ALS 基因表达量均达到各自最大值,分别是对照的 8.72 倍和 4.75 倍,且稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 基因表达量极显著高于敏感稗 18 - NJ 种群,从处理 3 d 开始,稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 基因表达量显著低于敏感稗 18 - NJ 种群,结果表明稗 18 - WJJ - Ec 种群存在靶标酶基因过量表达机制(图 5)。



3 结论与讨论

由于五氟磺草胺作用位点单一,加上农户长期反复单一使用,以及施用方法不当等因素,使得抗五氟磺草胺稗属杂草的发生情况日益严重。本研究结果表明稗 18 - WJJ - Ec 种群是 18 - NJ 种群抗性指数的 42.79 倍,属于高抗水平,该结论与马国兰等的研究结果^[5]相似。

靶标位点突变是杂草对除草剂产生抗性的直接原因,不同突变位点使得杂草对不同作用机制的除草剂产生抗性。本研究中,稗 18 - WJJ - Ec 种群

ALS 氨基酸序列 574 位 Trp 突变成了 Leu, 导致稗 18 - WJJ - Ec 种群对五氟磺草胺产生了抗性。Trp - 574 - Leu 是杂草常见的 ALS 基因突变方式, 目前有关稗 ALS 氨基酸序列 Trp - 574 - Leu 突变生物型已有较多研究报道^[11,13,18-19], 其他稗属杂草有关 ALS 氨基酸序列 Trp - 574 - Leu 突变生物型的报道较少, 目前报道的有水田稗 (*Echinochloa oryzoides*)^[20] 和水稗^[12] 等。此外, 稗作为六倍体植物, 其 ALS 基因序列存在 3 个不同的拷贝, 即 *ALS1*、*ALS2* 和 *ALS3*, 研究表明 *ALS1* 和 *ALS2* 基因拷贝是所有物种的同源基因, 而稗属杂草则是多了 *ALS3* 基因拷贝^[13]。稗属杂草的 3 个 ALS 基因拷贝均参与了杂草的靶标抗性进化, 而稗属杂草对除草剂抗性的高低, 可能与靶标基因不同拷贝发生抗性位点突变频率有关^[21]。本研究结果表明, 稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 氨基酸 Trp - 574 - Leu 突变主要发生在 *ALS2* 基因序列拷贝上。而 Trp - 574 - Leu 突变位点发生在稗 ALS 基因不同序列拷贝上, 是否会影响稗对五氟磺草胺的抗性, 有待进一步研究确认。

杂草抗药性的产生, 也可能由靶标酶基因表达量上调所介导^[22], 而在发生靶标抗性突变位点的杂草生物型中, 靶标酶基因过量表达现象鲜有报道, 此外有研究表明抗性种群靶标酶基因表达量也可能低于敏感种群^[10]。本研究结果表明, 稗 18 - WJJ - Ec 种群存在靶标酶基因过量表达机制, 该结论与 Yu 等研究结果相似^[23]。靶标酶基因过量表达导致杂草靶标酶含量提高, 从而对除草剂产生抗性, 同时靶标酶活性的增强, 也会提高杂草的抗药性。本研究结果表明, 稗 18 - WJJ - Ec 种群 ALS 含量提高, 与本研究靶标酶基因过量表达结果相符, 此外, 稗 18 - WJJ - Ec 种群离体 ALS 对五氟磺草胺的敏感性降低, 表明该种群 ALS 活性增强, 该结论与 Yu 等的研究结果^[16] 一致。

为了确定稗 18 - WJJ - Ec 种群是否还存在非靶标抗性机制以及对其他相同作用机制或不同作用机制除草剂的抗性情况, 后续可以开展对稗 18 - WJJ - Ec 种群非靶标抗性机制以及交互抗性和多抗性的相关探究。此外, 稗对五氟磺草胺的抗性高低, 可能与抗性突变位点由稗 ALS 基因不同拷贝携带有关, 后续可以筛选出稗不同拷贝 Trp - 574 - Leu 纯合突变生物型, 研究其相关抗性机制, 同时探究稗对五氟磺草胺抗性的高低是否与 ALS 基因不同拷贝的表达量以及稗 ALS 基因不同拷贝携带 Trp -

574 - Leu 突变位点有关。

参考文献:

- [1] 张 昊, 张 勇, 潘月敏, 等. 安徽省部分稻区稗草抗药性初探 [J]. 杂草学报, 2021, 39(3): 44 - 50.
- [2] 房加鹏. 稗对五氟磺草胺靶标抗性机理的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018: 17 - 18.
- [3] 宋 英, 张自常, 顾俊荣, 等. 稗草出苗时间和密度对机直播水稻产量的影响 [J]. 杂草学报, 2021, 39(3): 67 - 73.
- [4] 张 帅. 2019 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议 [J]. 中国植保导刊, 2020, 40(3): 64 - 69.
- [5] 马国兰, 刘都才, 张 帅, 等. 稻田稗属杂草田间种群对五氟磺草胺的抗性监测 [J]. 农药学报, 2021, 23(5): 905 - 914.
- [6] Yu Q, Abdallah I, Han H P, et al. Distinct non - target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS - inhibiting herbicides in multiple herbicide - resistant *Lolium rigidum* [J]. Planta, 2009, 230(4): 713 - 723.
- [7] 董立尧, 高 原, 房加鹏, 等. 我国水稻田杂草抗药性研究进展 [J]. 植物保护, 2018, 44(5): 69 - 76.
- [8] 毕亚玲, 李君君, 戴玲玲, 等. 杂草对除草剂非靶标抗性机理研究进展 [J]. 植物保护, 2020, 46(5): 1 - 5, 12.
- [9] Fang J P, Liu T T, Zhang Y H, et al. Target site - based penoxsulam resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus - galli*) from China [J]. Weed Science, 2019, 67(3): 1 - 7.
- [10] Fang J P, Yang D C, Zhao Z R, et al. A novel Phe - 206 - Leu mutation in acetolactate synthase confers resistance to penoxsulam in barnyardgrass [*Echinochloa crus - galli* (L.) P. Beauv.] [J]. Pest Management Science, 2022, 78(6): 2560 - 2570.
- [11] Yang Q, Yang X, Zhang Z C, et al. Investigating the resistance levels and mechanisms to penoxsulam and cyhalofop - butyl in barnyardgrass (*Echinochloa crus - galli*) from Ningxia Province, China [J]. Weed Science, 2021, 69(4): 1 - 25.
- [12] Liu J, Fang J P, He Z Z, et al. Target site - based resistance to penoxsulam in late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*) from China [J]. Weed Science, 2019, 67(4): 380 - 388.
- [13] Löbmann A, Schulte M, Runge F B, et al. Occurrence, resistance factors and cross - resistance patterns to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) of *Echinochloa crus - galli* (L.) Pal [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2021, 128(3): 843 - 852.
- [14] Dalazen G, Markus C, Merotto A. Differential expression of genes associated with degradation enhancement of imazethapyr in barnyardgrass (*Echinochloa crus - galli*) [J]. Journal of Agricultural Science, 2018, 10(9): 389.
- [15] 李飞乐. 水稻田稗草对五氟磺草胺的抗药性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 32 - 35.
- [16] Yu Q, Han H P, Vila - Aiub M M, et al. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 3925 - 3934.
- [17] Saini R K, Malone J, Preston C, et al. Target enzyme - based resistance to clethodim in *Lolium rigidum* populations in Australia

薛 站,霍晓敏,张雅昆,等. 黄花棘豆生物碱成分及其抗斜纹夜蛾活性研究[J]. 江苏农业科学,2022,50(19):110-116.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.19.017

黄花棘豆生物碱成分及其抗斜纹夜蛾活性研究

薛 站,霍晓敏,张雅昆,王亭亭,曾艳荣,谭承建

(贵州民族大学,贵州贵阳 550025)

摘要:采用硅胶柱层析、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 以及半制备型高效液相色谱等分离手段,从黄花棘豆提取物中得到 21 个生物碱成分,分别鉴定为苦参碱、异苦参碱、别苦参碱、槐定碱、氧化槐定碱、(—)-7,11-去氢苦参碱、12,13-去氢苦参碱、12,13-去氢槐定碱、13,14-去氢槐定碱、槐胺碱、7 β -槐胺碱、5 β ,7 β -槐胺碱、5 β -氧化槐胺碱、槐醇、8 β -羟基槐定碱、(—)-14 β -羟基苦参碱、Ochrocephalamine A、N-甲基金雀花碱、白羽扇豆碱、(+)-17-氧代白羽扇豆碱、氧化白羽扇豆碱。化合物 2、化合物 3、化合物 5、化合物 8~化合物 9、化合物 11~化合物 16、化合物 18、化合物 20、化合物 21 为首次从该植物中分离得到。采用浸虫浸叶法对 12 个含量较大的化合物进行抗斜纹夜蛾幼虫活性测试,结果显示除化合物 6 以外,其余 11 个化合物均表现出一定的杀虫活性,且化合物 12 表现出较强的杀虫活性,浓度为 10 mg/mL 时 72 h 的校正死亡率为 58.0%。

关键词:黄花棘豆;生物碱;斜纹夜蛾;杀虫活性;结构鉴定

中图分类号:S482.3⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)19-0110-07

黄花棘豆(*Oxytropis ochrocephala* Bunge)是豆科棘豆属多年生草本植物,俗称马绊肠、团巴草,是我国新疆、西藏、青海、甘肃等西部地区草场的一种毒草^[1]。马、牛、绵羊、山羊等牲畜连续采食 30~40 d 即出现以运动机能障碍如摇头、眼睛呆滞、反应迟钝、步态蹒跚、四肢无力、后肢麻痹等为特征的中毒

症状。出现中毒症状的牲畜最终将死亡,给当地畜牧业造成了严重的经济损失。

黄花棘豆根系发达,抗旱、抗寒、耐盐碱能力及繁殖能力强^[2],分布面积广,是优良的固沙、防风植被。近年来,由于乱砍滥伐、土地荒漠化,该植物迅速蔓延,成为草原优势种群,给草原生态和畜牧业带来较大压力。前期从该植物中发现了结构新颖的喹诺里西啶类生物碱,并合成槐定碱衍生物,相关化合物表现出抗乙型肝炎病毒(HBV)、抗肿瘤和对斜纹夜蛾幼虫的杀虫活性^[3-7]。为进一步丰富黄花棘豆生物碱成分的基础研究,为其资源化利用提供依据,本研究继续对该植物的化学成分进行研究,并评价相关化合物对斜纹夜蛾的杀虫活性。

收稿日期:2021-10-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:32160110、31660103);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2019]2414);贵州省研究生教育创新计划(编号:黔教合 YJSCXJH[2020]134)。

作者简介:薛 站(1995—),女,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事天然产物提取与分离研究。E-mail:xuezhann1289@163.com。

通信作者:谭承建,博士,教授,从事天然产物药物化学研究。E-mail:tcj1229@163.com。

[J]. Weed Science,2015,63(4):946-953.

[18]Panozzo S,Scarabel L,Tranel P J,et al. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2013,105(2):93-101.

[19]Matzenbacher F O,Bortoly E D,Kalsing A,et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides[J]. The Journal of Agricultural Science,2015,153(6):1044-1058.

[20]Kaloumenos N S,Chatzilazaridou S L,Mylona P V,et al. Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.)[J].

Pest Management Science,2013,69(7):865-873.

[21]Panozzo S,Mascanzoni E,Scarabel L,et al. Target-site mutations and expression of ALS gene copies vary according to *Echinochloa species*[J]. Genes,2021,12(11):1841.

[22]Iwakami S,Uchino A,Watanabe H,et al. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species[J]. Pest Management Science,2012,68(7):1098-1106.

[23]Yu J L,McCullough P E,McElroy J S,et al. Gene expression and target-site mutations are associated with resistance to ALS inhibitors in annual sedge (*Cyperus compressus*) biotypes from Georgia[J]. Weed Science,2020,68(5):460-466.