

2023 VOL.37 NO. 5

ISSN 1000-8551

CN 11-2265/S

核农学报

JOURNAL OF NUCLEAR AGRICULTURAL SCIENCES

主办：中国原子能农学会

中国农业科学院农产品加工研究所

(原中国农业科学院原子能利用研究所)

第5届中国精品科技期刊

中文核心期刊

RCCSE中国权威学术期刊(A+)

中国科技论文统计源期刊

中国科技引文数据库统计期刊

CSCD中国科学引文数据库统计期刊

中国农业核心期刊



扫一扫，关注核农学报微信公众号
免费获取更多精彩文章

目 次

植 物 诱 变 育 种 · 农 业 生 物 技 术

- 889 菌根真菌对⁶⁰Co-γ辐射后铁皮石斛种子萌发的影响
..... 王淑华 马艳军 姚娜 范可可 胡晓萌 江泽慧 胡陶
- 897 高花青苷同源四倍体紫菜薹新材料的创制及特性分析
..... 李孟杰 张晨 王美云 杨晓雪 侯喜林 王建军 周鸿章 刘同坤
- 907 复合诱变选育高产赤藓糖醇解脂亚罗酵母及其发酵工艺优化
..... 刘芳美 夏凯 彭艳婷 赵学群 沙如意 黄俊
- 917 毛竹*ABCG*基因鉴定及其表达模式研究
..... 李紫阳 杨克彬 朱成磊 刘燕 郭栋 肖晓燕 高志民
- 927 *Brevibacillus brevis* B011次级代谢物中抗青枯菌活性物质的纯化鉴定及生物合成基因簇分析
..... 周向平 陈武 刘天波 王运生 王凯歌 刘峰 李小慧 袁志辉
- 936 河北省不同苘麻种群对莠去津的抗性水平及抗性机制研究
..... 郭倩颖 李哲 马树杰 王明思 杨娟 张利辉
- 944 玉米农艺性状配合力全基因组关联分析和预测
..... 马娟 刘京宝 朱卫红 黄璐 宇婷 乔江方
- 955 甘薯曲叶病毒PCR-层析试纸条快速检测方法的建立 张小梅 李广录 刘宇 侯文邦

农 产 品 辐 照 研 究 · 食 品 科 学

- 962 高能电子束辐照对杜仲叶品质的影响研究
..... 唐艺文 陈谦 王钢 付孟 黄敏 王丹 高鹏
- 971 γ射线、电子束辐照处理对芦苇木质纤维素结构及酶解性能的影响
..... 陈亮 武小芬 齐慧 王丹阳 刘安 邓明 王克勤

文章编号: 1000-8551(2023)05-0936-08

河北省不同苘麻种群对莠去津的抗性水平及抗性机制研究

郭倩颖^{1,2} 李哲¹ 马树杰² 王明思² 杨娟^{1,*} 张利辉^{2,*}¹河北科技师范学院, 河北省作物逆境生物学重点实验室, 河北 秦皇岛 066004;²河北农业大学, 植物保护学院, 河北 保定 071000)

摘要: 为了明确河北省玉米田杂草苘麻对莠去津的抗性水平及抗性机制, 本研究采用整株生物测定法对来自河北省6个不同地区的苘麻种群进行莠去津抗性水平测定, 利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定解毒代谢酶谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和细胞色素P450氧化酶(P450s)对莠去津的非靶标抗性, 并对靶标基因*psbA*进行了序列比对和表达量测定。结果显示, 种群HB-3对莠去津最敏感, 种群HB-6表现为高抗, 抑制生长中量(GR_{50})分别为1 662.75和84 721.13 g·hm⁻², 抗性种群较敏感种群的抗性倍数为50.95; 抗性种群HB-6中, GSTs抑制剂NBD-Cl和P450s抑制剂马拉硫磷对莠去津具有增效作用, 与未使用GSTs和P450s的处理相比, 该种群的 GR_{50} 分别降低了11.61倍和27.77倍, 且GSTs和P450s活性均高于敏感种群HB-3; 抗性种群HB-6的靶标基因*psbA*未发生突变, 经莠去津处理后, 该种群*psbA*基因表达量低于敏感种群HB-3。综合上述结果可知, 苘麻对莠去津的抗性是由GSTs和P450s介导的解毒代谢作用增强引起的。本研究结果为苘麻的科学防除和莠去津的减量化使用奠定了理论基础。

关键词: 苘麻; 莠去津; GSTs; P450s; 抗性

DOI: 10.11869/j.issn.1000-8551.2023.05.0936

苘麻(*Abutilon theophrasti* Medicus)是锦葵科一年生杂草, 危害玉米、大豆等作物, 通过竞争光照、水分和养分而造成作物减产^[1-2]。苘麻结籽量大, 种子活力高, 防控难度较大^[3-4]。近年来, 农田耕作制度改变和除草剂单一使用, 使杂草群落的演替加快, 目前苘麻的发生和危害处于上升态势, 已逐渐成为玉米田的恶性杂草。

莠去津(atrazine)属于光系统II(photosystem II complex, PS II)抑制剂, 能够有效防除玉米田一年生禾本科杂草和阔叶杂草, 其对某些多年生杂草也有一定的防除效果且因莠去津既能被杂草根吸收, 也能被茎叶吸收, 常作为土壤封闭除草剂和苗后茎叶处理剂使用^[5]。但长期大面积使用, 加速了抗莠去津杂草生物型的出现, 自1972年美国马里兰州首次发现绿穗苋(*Amaranthus hybridus* L.)对莠去津产生抗性以来, 全球共发现抗莠去津杂草生物型66个, 从数量上仅次于乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS)抑制剂类

除草剂的杂草抗性生物型^[6]。杂草对除草剂的抗性机制可分为非靶标抗性(non-target-site-based resistance, NTSR)和靶标抗性(target-site resistance, TSR)^[7-8]。非靶标抗性包括减少杂草对除草剂吸收和传导, 增强解毒代谢作用以及对除草剂的屏蔽或隔离作用等^[9]。我国辽宁地区的苘麻种群对莠去津产生了较低水平抗性, 抗性指数为1.7~4.0^[10]。此外, 硬直黑麦草(*Lolium rigidum* Gaud.)对莠去津产生抗性是由于体内P450s代谢作用增强所致^[11]。长芒苋(*Amaranthus palmeri* S. Watson.)抗性种群谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)对莠去津的代谢速度比敏感种群快, 导致其对莠去津产生抗性^[12]。靶标抗性机制主要是除草剂作用位点的基因发生突变, 或者靶标酶过度表达^[13]。藜(*Chenopodium album* L.)^[14]、早熟禾(*Poa annua* L.)^[15]由于*psbA*基因编码的氨基酸突变(Ser264Gly)导致其对莠去津的吸收能力减弱, 从而产生抗性。

收稿日期: 2022-07-13 接受日期: 2022-09-05

基金项目: 河北省省级科技计划资助(19226504D), 河北省自然科学基金(C2021407005), 河北科技师范学院研究生创新资助项目(CCZZ202104)

作者简介: 郭倩颖, 女, 主要从事杂草抗性研究。E-mail: gqy1151734564@163.com

* 通讯作者: 杨娟, 女, 讲师, 主要从事杂草生物学与抗性研究。E-mail: yangjuan018@126.com;

张利辉, 女, 教授, 主要从事杂草生物学与防控研究。E-mail: zhanglihui@hebau.edu.cn。同为通讯作者。

近年来,农业生产上莠去津对苘麻的防治效果不佳,田间推荐剂量不能有效防除苘麻,但目前在我国鲜见解析苘麻对莠去津抗性机制的相关报道。因此,本研究以采自河北省玉米田的6个苘麻种群为研究对象,通过整株生物测定法测定苘麻种群对莠去津的敏感性差异,以明确其抗性水平;并从非靶标抗性和靶标抗性两方面对抗性种群的抗性机制进行分析,以期对河北省玉米田苘麻的抗药性治理和延缓抗性杂草发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试苘麻种子 于2020年秋季和2021年秋季在河北省不同典型地区的玉米田单株采集6个苘麻种群种子(具体采集信息见表1),晾干后放于4℃条件下储存备用。

表1 苘麻种群采集地点

种群	采集地点	用药历史
Population	Collection locations	Herbicide using history
HB-1	河北省张家口市宣化区沙岭子镇二里半村	1年
HB-2	河北省邢台市威县东关村	3年
HB-3	河北省保定市南二环五尧新村	未使用
HB-4	河北省秦皇岛市昌黎县河北科技师范学院施各庄农场	2年
HB-5	河北省承德市平泉县茅兰沟乡喇嘛洞村	1年
HB-6	河北省邢台市隆尧县双碑乡北村	5年

1.1.2 药剂及试剂 38%莠去津悬浮剂(山东滨农科技有限公司),植物基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化技术有限公司),DNA凝胶回收试剂盒、总RNA提取试剂盒II R6934[安诺伦(北京)生物科技有限公司],Hieff qPCR SYBR® Green Master Mix(High Rox)荧光定量PCR试剂盒 Hifair® II 1st strand cDNA Synthesis Supermix for qPCR(上海翊圣生物科技有限公司),大肠杆菌TG1感受态细胞(北京博迈德生物技术有限公司),95%马拉硫磷原药(安徽瑞辰植保工程有限公司),98%NBD-Cl(上海麦克林生化科技有限公司),酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)试剂盒、植物谷胱甘肽-S-转移酶、植物细胞色素P450氧化酶(黄石市蓝图生物科技有限公司)。

1.1.3 试验仪器 3WP-2000型行走式喷雾塔(农业农村部南京农业机械化研究所),梯度PCR仪、ABI

7500型实时荧光定量PCR仪(美国应用生物系统公司),DYY-6C型电泳仪电源、DUT-48切胶仪(杭州米欧仪器有限公司)。

1.2 苘麻种群幼苗培养

将营养土:蛭石按1:1的比例搅拌均匀,装入7 cm×7 cm×10 cm花盆中,将上述花盆放入塑料托盘中,灌水,使花盆吸水备用。挑选饱满种子,使用70%酒精浸泡10 min对种子进行消毒,然后用无菌水冲洗3次。将种子放入60℃水浴锅加热30 min,取出后加入300.00 mg·kg⁻¹赤霉素浸泡,放入培养箱(温度:25~28℃,湿度:60%~70%,光照/黑暗:14 h/10 h)。待种子露白后播种到花盆中,每盆5颗种子,覆土1 cm,24 h后采用3WP-2000型行走式喷雾塔进行苗前土壤喷雾处理。

1.3 试验方法

1.3.1 苘麻种群对莠去津的抗性水平测定 采用整株测定法,按1.2所述方法种植6个苘麻种群,38%莠去津悬浮剂施药剂量为997.50、1 995.00、3 990.00、7 980.00、31 920.00和63 840.00 g·hm⁻²,每个处理重复3次,同时设清水对照。施药后观察苘麻对莠去津的反应症状,21 d后剪取所有处理的苘麻植株地上部分,称量鲜重,计算处理占对照鲜重百分比,绘制剂量-反应曲线,计算抑制生长中量GR₅₀及抗性倍数(resistance index, RI)。计算公式如下:

$$Y = Y_x/Y_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$Y = C + (D - C)/[1 + (X/GR_{50})^b] \quad (2)$$

$$RI = \frac{\text{抗性种群}GR_{50}}{\text{敏感种群}GR_{50}} \quad (3)$$

式中,X为莠去津使用剂量;Y_x为施用剂量为X时苘麻地上部鲜重;Y₀为不用药对照组苘麻地上部鲜重;Y为莠去津施用剂量为X时苘麻地上部鲜重占对照干重的比率;C为莠去津使用剂量反应下限;D为莠去津使用剂量反应上限;GR₅₀为苘麻生长抑制中量;b为斜率。

1.3.2 酶抑制剂NBD-Cl和马拉硫磷对莠去津的增效作用 以苘麻敏感种群HB-3和抗性种群HB-6为研究对象,测定GSTs抑制剂4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD-Cl)和P450s抑制剂马拉硫磷对苘麻对莠去津抗性水平的影响。按1.2所述方法种植苘麻。分别将NBD-Cl(270.00 g·hm⁻²)用50 μL氯仿进行溶解,马拉硫磷(1 000.00 g·hm⁻²)用50 μL丙酮进行溶解,之后再用0.1%吐温-80水溶液定容至20 mL。待抑制剂喷施30 min后再进行莠去津药剂处理。莠去津的处理剂量为997.50、1 995.00、3 990.00、7 980.00

和 31 920.00 g·hm⁻²。每个处理 3 个重复,设 0.1% 吐温-80 水溶液为对照。处理后 21 d 按照 1.3.1 的方法计算抑制生长中量 GR₅₀ 及差异倍数(fold change, FC):

$$FC = \frac{GR_{50}(\text{莠去津})}{GR_{50}(\text{莠去津} + \text{酶抑制剂})} \quad (4)。$$

1.3.3 苘麻谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和细胞色素 P450 氧化酶(P450s)活性测定 选取苘麻敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6 进行 GSTs、P450s 活性研究,按 1.2 所述方法种植苘麻,喷施莠去津田间推荐剂量(1 995.00 g·hm⁻²)。分别于施药前和施药后 1、3、5、7、9、14 d 进行取样,用液氮将样品迅速冷冻,置于-80℃冰箱保存备用。采用 ELISA 试剂盒测定解毒代谢酶 GSTs 和 P450s 活性。

1.3.4 苘麻 *psbA* 基因克隆及序列比对 选取苘麻敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6,按 1.2 所述方法种植,待植株生长至 4 叶期时,剪取叶片用液氮迅速冷冻,放入-80℃冰箱保存备用后,采用 DNA 提取试剂盒提取苘麻 DNA。参考 GenBank 数据库已报道的苘麻 *psbA* 基因序列(NC_053702.1),扩增序列包含已报道的抗性突变位点(表 2),将设计好的 QM-F1/QM-R1 引物送至北京博迈德基因技术有限公司合成,然后采用梯度 PCR 筛选出引物最佳退火温度。PCR 扩增体系为 25 μL: 10 μmol·L⁻¹ 正反引物各 0.5 μL、2×Tap PCR MasterMix 12.5 μL、模板 3.5 μL、ddH₂O 8.0 μL。扩增程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 共 35 个循环; 72℃终延伸 10 min。PCR 扩增结束后,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,切取含有目的条带的凝胶,使用 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。将回收产物与 pMD18-T vector 连接,转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞。经过涂板和 37℃过夜培养,挑取单菌落进行液体振荡培养 4 h,将菌液送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,采用 DNAMAN V9.0 软件对敏感和抗性苘麻种群的 *psbA* 基因部分序列进行比对分析。

表 2 *psbA* 基因扩增引物

Table 2 Amplification primers of *psbA* gene

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature/℃	扩增片段 Amplicon size/bp
QM-F1	TCGGCGGCTCCCTATT	56	320
QM-R1	CACGACCTTGACTATCAACTACA		

注: F 为正向引物, R 为反向引物。下同。

Note: F is the forward primer, R is the reverse primer. The same as following.

1.3.5 靶标基因 *psbA* 表达量测定 选取苘麻敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6,按 1.2 所述方法种植,喷施莠去津田间推荐剂量(1 995.00 g·hm⁻²)。本研究共包括 4 组处理: 未经莠去津处理的敏感种群; 莠去津处理 72 h 之后的敏感种群; 未经莠去津处理的抗性种群; 莠去津处理 72 h 之后的抗性种群, 每个处理 3 次重复。取各处理植株整体,用无菌水冲洗后迅速用液氮冷冻,于-80℃冰箱保存备用。RNA 提取参考总 RNA 提取试剂盒 II R6934 说明书进行。选用 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus) 将 RNA 反转录成 cDNA,于-20℃冰箱保存。将苘麻 cDNA 按 5 倍梯度稀释后作为模板,进行下一步试验。

本试验参考 GenBank 数据库已报道的苘麻 *psbA* 基因序列(NC_053702.1)设计荧光定量引物,以 *Histone* 作为内参基因^[16]进行实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)反应(表 3),本试验 QM-F2/QM-R2、*Histone*-F/*Histone*-R 引物由北京博迈德基因技术有限公司合成。按照 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(High Rox)荧光定量试剂盒说明书配制荧光定量反应体系,采用 qRT-PCR 仪进行反应。*psbA* 基因 PCR 扩增体系为 10 μL: 10 μmol·L⁻¹ 正反引物各 0.5 μL、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(High Rox) 5.0 μL、cDNA 模板 1.0 μL、ddH₂O 3.0 μL。扩增程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 10 s, 60℃复性 30 s, 共 40 个循环。

表 3 *psbA* 基因 qRT-PCR 扩增引物

Table 3 qRT-PCR amplification primers of *psbA* gene

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
QM-F2	GGTGCCATTATTCCTAC
QM-R2	CTAAGTTCCTCACTCAGC
<i>Histone</i> -F	GAGCAACAGTTCACGACGGTATC
<i>Histone</i> -R	GGAAGGCTCCAAGGAAGCAACT

1.4 数据处理

使用 SPSS 19.0 软件进行数据统计、差异显著性分析,利用 Sigmaplot 14.0 软件绘制剂量-反应曲线,求 GR₅₀ 和 FC。

抗性水平分级标准,敏感种群: 1≤RI<2; 低抗种群: 2≤RI<5; 中抗种群: 5≤RI<10; 高抗种群: RI≥10^[17]。

采用 2^{-ΔΔCt} 法计算苘麻 *psbA* 基因表达量。

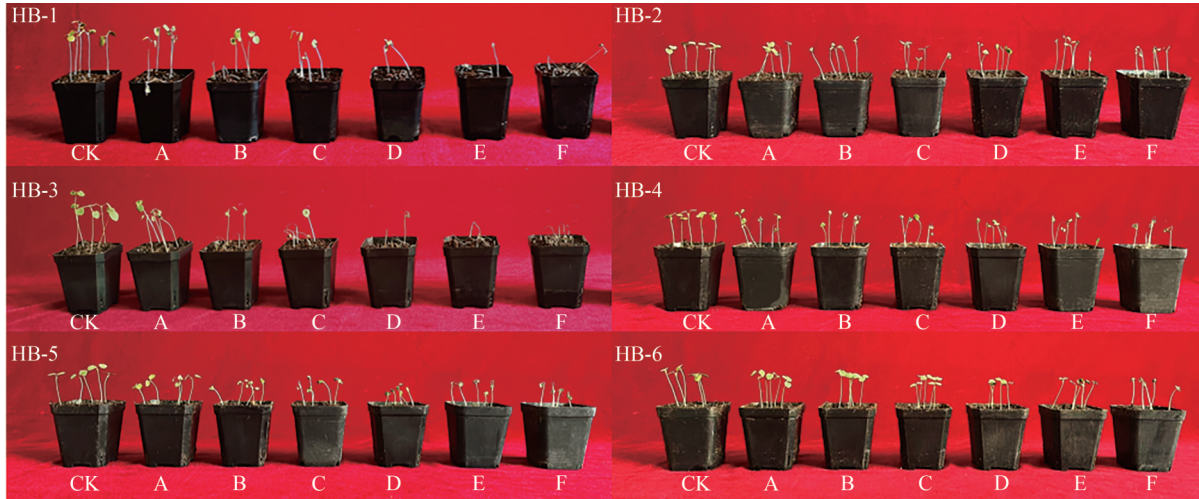
2 结果与分析

2.1 不同地区苘麻种群对莠去津的抗性水平

6 个不同地区苘麻种群施药后 21 d 对莠去津的症

状反应见图 1。从图中可以看出,不同地区的苘麻种群对莠去津的反应存在差异。38% 莠去津悬浮剂供试剂量为 $997.50 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时,即可明显抑制种群 HB-3 的生长,叶片边缘开始干枯;其他 5 个种群正常生长。剂量为 $1995.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时,除种群 HB-6 植株无明显受害症状

以外,其他 5 个种群均出现叶片边缘黄化干枯。施用剂量为 $3990.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时,种群 HB-6 仅株高稍有降低,叶片无明显受害症状;其他 5 个种群植株叶片大部分失绿、干枯,并开始死亡。施用剂量为 $31920.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时,种群 HB-6 植株叶片枯萎并开始死亡。



注: CK: 清水对照; A: $997.50 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$; B: $1995.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$; C: $3990.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$; D: $7980.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$; E: $31920.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$; F: $63840.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。
Note: CK: Control check with water. A: $997.50 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$. B: $1995.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$. C: $3990.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$. D: $7980.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$. E: $31920.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$. F: $63840.00 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$.

图 1 苘麻种群在施用莠去津 21 d 后的症状表现

Fig.1 Injury symptoms of *A. theophrasti* populations 21 days after treatment of atrazine

通过剂量反应曲线可知,在供试剂量范围内,随着莠去津处理剂量的增加,不同种群苘麻的生物量降低(图 2)。由表 4 可知,不同苘麻种群对莠去津的抗性水平不同,其中抗性种群 HB-6 的 GR_{50} 值最大,为 $84721.13 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$;敏感种群 HB-3 的 GR_{50} 值最小,为

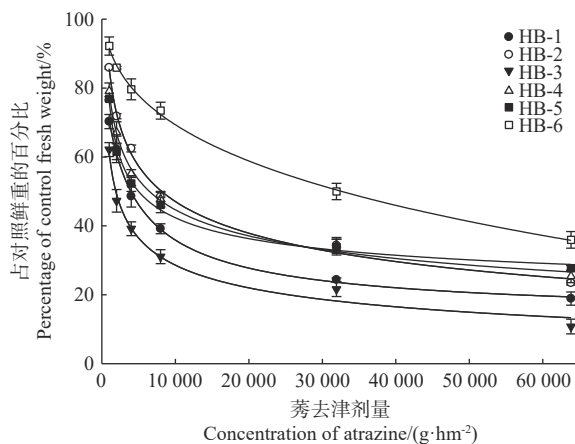
$1662.75 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$,抗性种群较敏感种群的抗性倍数为 50.95。

2.2 酶抑制剂 NBD-Cl 和马拉硫磷对莠去津的增效作用

使用 GSTs 抑制剂 NBD-Cl 和 P450s 抑制剂马拉硫磷处理后,对苘麻生长无明显影响。抑制剂处理后,敏感种群 HB-3 对莠去津的敏感性无明显变化,但提高了抗性种群 HB-6 对莠去津的敏感性。用 NBD-Cl 抑制剂预处理后,抗性种群 HB-6 的 GR_{50} 值由 $84721.13 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 降至 $7295.13 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$, GR_{50} 值差异倍数为 -11.61。用马拉硫磷抑制剂预处理后,抗性种群 HB-6 的 GR_{50} 值由 $84721.13 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 降至 $3051.29 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$, GR_{50} 值差异倍数为 -27.77 (表 5)。由上述结果可知,抗性种群 HB-6 对莠去津产生抗性与 GSTs 和 P450s 的解毒代谢有关。

2.3 莠去津对苘麻谷胱甘肽-S-转移酶和细胞色素 P450 氧化酶活性的影响

为了研究苘麻体内 GSTs、P450s 对莠去津的解毒代谢能力,采用 ELISA 法测定了莠去津处理前后苘麻敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6 的 GSTs 和 P450s 活性变化。



注:图中数据为平均值±标准差。

Note: Data in the figure are mean±SD.

图 2 不同地理苘麻种群对莠去津剂量-反应曲线

Fig.2 Dose-response curves to atrazine in different geographical populations of *A. theophrasti*

表4 不同苘麻种群对莠去津的剂量反应

Table 4 Dose response to atrazine in different populations of *A. theophrasti*

种群 Populations	剂量反应方程 Dose-response equation	$GR_{50}/(g \cdot hm^{-2})$	相关系数 r Correlation coefficient	抗性倍数 RI
HB-3	$Y=95.28/[1+(X/1662.75)^{0.63}]+4.86$	1 662.75	0.99	1.00
HB-5	$Y=75.14/[1+(X/2188.71)^{0.83}]+25.13$	2 188.71	0.99	1.32
HB-1	$Y=89.54/[1+(X/2807.97)^{0.71}]+10.43$	2 807.97	0.99	1.69
HB-4	$Y=80.18/[1+(X/3287.50)^{0.78}]+20.09$	3 287.50	0.99	1.98
HB-2	$Y=81.72/[1+(X/4540.98)^{0.89}]+18.76$	4 540.98	0.99	2.73
HB-6	$Y=140.21/[1+(X/84721.13)^{0.60}]-40.02$	84 721.13	0.99	50.95

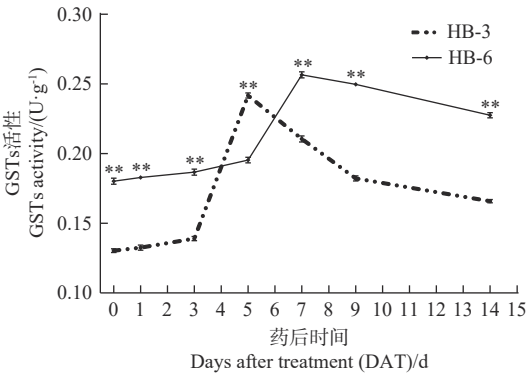
表5 添加酶抑制剂NBD-Cl和马拉硫磷时苘麻种群对莠去津的抗性水平

Table 5 The resistance to atrazine in *A. theophrasti* with the addition of enzyme inhibitors NBD-Cl and malathion

种群 Populations	药剂 Herbicides	$GR_{50}/(g \cdot hm^{-2})$	差异倍数 FC
HB-3	莠去津	1 662.75	—
	莠去津+NBD-Cl	2 198.58	0.76
	莠去津+马拉硫磷	2 630.71	0.63
HB-6	莠去津	84 721.13	—
	莠去津+NBD-Cl	7 295.13	-11.61
	莠去津+马拉硫磷	3 051.29	-27.77

由图3可知,莠去津处理后,两个种群的GSTs活性都相对于未施药时有所升高,整体呈现先上升后下降趋势。抗性种群HB-6的GSTs活性在1~7 d内缓慢上升,第7天时GSTs活性达到最大值,为 $0.26 U \cdot g^{-1}$,随着莠去津处理时间的延长,GSTs活性略有下降。敏感种群HB-3的GSTs活性在1~5 d内缓慢上升,第5天时GSTs活性达到最大值,为 $0.24 U \cdot g^{-1}$,随着莠去津处理时间的延长,GSTs活性逐渐降低。以上结果表明,GSTs在苘麻对莠去津的解毒代谢过程中发挥了一定的作用,种群HB-6的GSTs对莠去津的解毒能力高于种群HB-3,种群HB-6对莠去津产生抗性与GSTs活性增强有关。

由图4可知,喷施莠去津后,P450s活性表现为,抗性种群HB-6整体先上升后下降,敏感种群HB-3整体呈先下降后上升。抗性种群HB-6的P450s活性在第5天时达到最大值,为 $0.24 U \cdot g^{-1}$,随着莠去津处理时间的延长,P450s活性略有下降,14 d后P450s活性上升且高于敏感种群HB-3。敏感种群HB-3的P450s活性缓慢上升,第5天时最低,随着处理时间的延长,第9天时P450s活性达到最大值,为 $0.20 U \cdot g^{-1}$,极显著高于HB-6,14 d后P450s活性逐渐下降。说明抗性种群HB-6通过提高P450s活性加快对莠去津的解毒代谢速度,表明苘麻对莠去津的抗性与P450s解毒代谢作



注:图中数据为平均数±标准差;**表示相同处理时间敏感组和抗性组在 $P<0.01$ 水平差异极显著。下同。

Note: Data in the figure are mean±SD. ** indicate extremely significant differences between the sensitive group and the resistant group at same treatment time at 0.01 level. The same as following

图3 莠去津对苘麻谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响
Fig.3 Effect of atrazine on glutathione-S-transferase activity in *A. theophrasti*

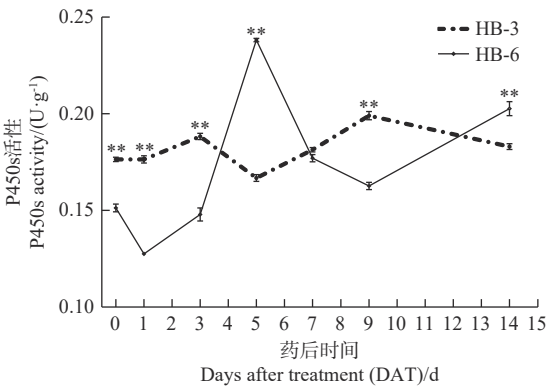


图4 莠去津对苘麻P450s活性的影响
Fig.4 Effect of atrazine on P450s activity of *A. theophrasti*

用增强有关。

2.4 苘麻psbA基因序列片段比对

利用引物QM-F1/QM-R1扩增苘麻psbA基因部分保守区域,将扩增序列在NCBI中进行BLAST比对,与苘麻psbA基因序列(NC_053702.1)的同源性为99%,

扩增片段大小为 489 bp, 证明扩增产物是包含已报道的抗性突变位点在内的苘麻 *psbA* 部分序列。使用 DNAMAN 软件比对了敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6 的 *psbA* 基因部分序列(图 5), 编码叶绿体 D1 蛋白 264 位

氨基酸为丝氨酸(Ser), 碱基序列未发生突变, 也未发现其他氨基酸代替, 如 Phe255Ile、Asn266Thr 或 Phe274Val, 表明导致种群 HB-6 对莠去津产生抗性与靶标基因 *psbA* 突变无关。

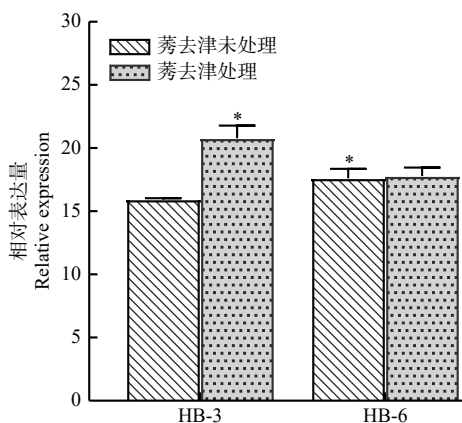


图 5 苘麻敏/抗种群 *psbA* 基因部分序列比对

Fig.5 Sequence comparison of mutation loci in *A. theophrasti* sensitive/resistant populations

2.5 莠去津对苘麻靶标基因 *psbA* 表达量的影响

为了研究莠去津对苘麻靶标基因 *psbA* 表达量的影响, 利用 qRT-PCR 技术测定了 1 995. 00 g·hm⁻² 莠去津苗前处理苘麻后靶标基因 *psbA* 在敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6 中的表达量(图 6)。结果显示, 未喷施莠去津时, 抗性种群 HB-6 的 *psbA* 初始表达量与敏感种群 HB-3 的差异显著; 经莠去津处理后, 2 个种群的 *psbA* 表达量均升高, 但种群 HB-3 的表达量高于种群 HB-6, 说明苘麻抗性种群 HB-6 *psbA* 基因表达量与其对莠去津产生抗性无关。



注: 图中数据为平均数±标准差; *表示相同处理敏感组和抗性组之间在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Data in the figure are mean±SD. * indicates significant differences between the sensitive group and the resistant group under the same treatment at 0.05 level.

图 6 不同苘麻种群 *psbA* 的相对表达量

Fig.6 The expression of *psbA* relative to the Histone in different *A. theophrasti* populations

3 讨论

杂草与农作物有较强的竞争性, 严重影响农作物的品质和产量。与人工除草相比, 除草剂可以高效地

清除杂草, 具有保障农业高产、稳产等优点, 已成为农田杂草防控的主要手段。但是, 如长期大量使用单一靶标除草剂, 选择压力会加快杂草抗药性的发生速度, 影响除草剂的除草效果^[18]。我国于 20 世纪 80 年代中期开始大面积推广使用莠去津, 至今已有约 40 年的时间, 由于莠去津在我国使用频率高、剂量大、时间长, 导致我国农田杂草对其产生了不同程度的抗性^[18]。其中, 辽宁省的鸭跖草(*Commelina communis* L.) 对莠去津产生了抗性, 其抗性种群较敏感种群对莠去津的抗性倍数高达 59.60^[17]。本试验中, 河北省内不同地区的苘麻种群对莠去津的敏感性不同, 与采集地莠去津用药史有关; 敏感种群 HB-3 所在采集地未使用过莠去津, GR_{50} 值最小, 为 1 662.75 g·hm⁻²; 种群 HB-6 抗性水平最高, 使用莠去津年限相对最长, GR_{50} 为 84 721.13 g·hm⁻², 抗性指数为 50.95。研究结果证实了杂草对莠去津的抗性与使用时间选择压有关。

在单一除草剂的长期选择压力下, 大穗看麦娘(*Alopecurus myosuroides* Huds.)^[19]、麦家公(*Lithospermum arvense* L.)^[20]、长芒苋^[21]等杂草主要通过增强自身解毒代谢酶 GSTs 和 P450s 的活性, 加快对除草剂的解毒代谢能力, 保护自身免受除草剂的损害, 从而对除草剂产生了非靶标抗性。马唐(*Digitaria sanguinalis* L.)^[22]、稗草(*Echinochloa crusgalli* [L.] Beauv.)^[23] 因体内 GSTs 活性增强而加快了对莠去津的解毒代谢作用, 从而对莠去津产生了抗药性; 在我国东北稻区发现, 抗性稻稗(*Echinochloa oryzicola* [Vasing.] Vasing) 种群 P450s 代谢作用增强, 导致其对五氟磺草胺产生了抗药性^[24]; 鸭跖草对莠去津的抗性是 GSTs 和 P450s 代谢作用增强和相关基因的表达量升高所致^[25]。本研究通过测定敏感和抗性种群 GSTs 抑制剂 NBD-Cl 和 P450s 抑制剂马拉硫磷对莠去津的增效作用以及 GSTs 和 P450s 活性, 发现抗性种群 HB-6 对莠去津产生的抗性与 GSTs 及 P450s 的活性增强有关, 进一步印证了 GSTs 和 P450s 对除草剂的解毒代谢是杂草对除草剂产生非靶

标抗性的原因之一。

前人已有研究发现,靶标酶基因突变和过量表达是引起杂草对除草剂产生靶标抗性的主要原因。由于 *EPSPS* 基因 Pro106Ser 突变和 *EPSPS* 过表达,导致牛筋草 (*Eleusine indica* [L.] Gaertn.) 对草甘膦产生抗性^[26]; 山东省小麦田大穗看麦娘对除草剂啶磺草胺、甲基二磺隆产生抗性是由于 *ALS* 基因编码的 Pro197Thr 发生了突变^[27]; 地肤 (*Kochia scoparia* [L.] Schrad.) 靶标基因 *EPSPS* 和 *psbA* 过量表达导致其对除草剂草甘膦和莠去津产生了抗性^[28-29]。野萝卜 (*Raphanus raphanistrum* Linnaeus) 由于靶标基因 Ser264Gly 突变导致其对赛克津产生抗性^[30]。本试验通过对苘麻敏感种群 HB-3 和抗性种群 HB-6 的 *psbA* 基因部分序列进行扩增和比对,未发现靶标基因 *psbA* 发生 Ser264Gly 突变;qRT-PCR 结果显示,莠去津处理后,抗性种群 HB-6 的 *psbA* 表达量反而低于敏感种群 HB-3,说明靶标基因 *psbA* 表达量变化与抗性种群 HB-6 对莠去津的抗性无关。由此推断,苘麻对莠去津产生的抗性主要是由 GSTs 和 P450s 活性增强引起的非靶标抗性,但是苘麻 GSTs 和 P450s 对莠去津的解毒代谢过程有待进一步研究。

4 结论

本研究通过整株生物测定法,明确了河北省不同地区苘麻种群对莠去津的抗性水平,并对敏/抗苘麻种群进行了 GSTs 和 P450s 活性差异研究。靶基因 *psbA* 突变位点检测及表达量研究,从非靶标机制和靶标机制两方面,明确了苘麻对莠去津的抗性是由 GSTs 和 P450s 介导的解毒代谢作用增强引起的。

参考文献:

- [1] Medonald A J, Riha S J, Mohler C L. Mining the record: Historical evidence for climatic influences on maize-*Abutilon theophrasti* competition[J]. Weed Research, 2004, 44(6): 439-445
- [2] Salisbury C D, Chandler J M. Interaction of cotton (*Gossypium hirsutum*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) plants for water is affected by their interaction for light[J]. Weed Science, 1993, 41(1): 69-74
- [3] Winter D M. The development of the seed of *Abutilon theophrasti*: II. ovule and embryo[J]. American Journal Botany, 1960, 47(1): 8-14
- [4] Lueschen W E, Andersen R N. Longevity of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* M.) seeds in soil under agricultural practices[J]. Weed Science, 1980, 28(3): 341-346
- [5] 司友斌, 孟雪梅. 除草剂阿特拉津的环境行为及其生态修复研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 451-455
- [6] Heap I. The International survey of herbicide resistant weeds [EB/OL]. (2022-07-08) [2022-07-08]. <http://www.weedscience.org>
- [7] Jugulam M, Shyam C. Non-target-site resistance to herbicides: Recent developments[J]. Plants, 2019, 8(10): 417
- [8] Ghanizadeh H, Buddenhagen C E, Harrington K C, Griffiths A G, Ngow Z. Pinoxaden resistance in *Lolium perenne* L. is due to both target-site and non-target-site mechanisms[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 184(1): 105103
- [9] Singh U P, Kamboj A, Sharma M. Herbicide resistance in weed and its management—a review [J]. International Journal of Education Technology and Scientific Researches, 2020, 8(12): 213-223
- [10] 孟威, 孙玉龙, 尉士伟, 汪涛, 纪明山. 春玉米田 3 种杂草对硝磺草酮和莠去津敏感性测定[J]. 农药, 2020, 59(10): 778-780
- [11] Ma H, Lu H, Han H, Yu Q, Powles S. Metribu zin resistance via enhanced metabolism in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population[J]. Pest Management Science, 2020, 76(11): 3785-3791
- [12] Shyam C, Borgato E A, Peterson D E, Dille J A, Jugulam M. Predominance of metabolic resistance in a six-way-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) population [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 11: 614618
- [13] Gaines T A, Duke S O, Morran S, Rigon C A G, Tranel P J, Küpper A, Dayan F E. Mechanisms of evolved herbicide resistance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(30): 10307-10330
- [14] McKenzie-Gopsill A, Graham G, Laforest M, Ibarra S, Hann S, Wagg C. Occurrence and management of PSII-inhibitor-resistant *Chenopodium album* L. in atlantic Canadian potato production [J]. Agronomy, 2020, 10(9): 1369
- [15] Svyantek A W, Aldahir P, Chen S, Flessner M L, McCullough P E, Sidhu S S, McElroy J S. Target and nontarget resistance mechanisms induce annual bluegrass (*Poa annua*) resistance to atrazine, amicarbazone, and diuron [J]. Weed Technology, 2017, 30(3): 773-782
- [16] 张莎莎, 张锐, 周焘, 郭三堆. 多启动子驱动苘麻 *epsps* 优化基因植物表达载体的构建及其转化[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(1): 48-54
- [17] 孙玉龙, 杜颖, 梁亚杰, 汪涛, 王金玲, 纪明山. 辽宁地区鸭跖草对莠去津抗性水平检测[J]. 农药, 2021, 60(5): 386-389
- [18] 杨娟, 于海燕, 李香菊, 董金皋. 不同地理种群鸭跖草 *Commelina communis* L. 对莠去津耐受性[J]. 植物保护, 2019, 45(1): 174-180
- [19] Lan Y N, Li W Y, Wei S H, Huang H J, Liu Z, Huang Z F. Multiple resistance to ACCase- and ALS-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in China [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 184(1): 105127
- [20] Rangani G, Noguera M, Salas-Perez R, Benedetti L, Roma-Burgos N. Mechanism of resistance to S-metolachlor in palmer amaranth [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 652581
- [21] 王恒智, 白霜, 吴小虎, 吴翠霞, 刘伟堂, 王金信. 小麦田麦家公对苯磺隆的抗性机理[J]. 植物保护学报, 2019, 46(1): 216-223
- [22] 王彦辉, 杨彩英, 马永林, 黄辉晔, 郭成林, 覃建林, 马跃峰. 广西甘蔗田马唐对莠去津抗性水平检测及机理初探[J]. 西南农业学报, 2017, 30(8): 1790-1794
- [23] 刘亚光, 唐兴佳, 刘蓝坤, 朱金文, 张建树. 黑龙江省稗草对三种玉米田常用除草剂抗药性研究[J]. 东北农业大学学报, 2018,

- 49(4): 29–39
- [24] 刘健, 房加鹏, 董立尧. 稻稗 HJHL-715 种群对五氟磺草胺的抗药性水平及抗性机理分析[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 197–204
- [25] Yang J, Yu H Y, Cui H L, Chen J C, Li X J. High antioxidant ability confer resistance to atrazine in *Commelina communis* L.[J]. Plants, 2021, 10(12): 2685
- [26] Gherekhloo J, Fernández-Moreno P T, Cruz R A, Ricardo, Sánchez-González E, Cruz-Hipolito H E, Domínguez-Valenzuela J A, Prado R D. Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 6702
- [27] 高兴祥, 李健, 张悦丽, 李美, 房锋. 山东省小麦田大穗看麦娘抗性水平、靶标抗性机理及田间防除效果测定[J]. 中国农业科学, 2020, 53(17): 3518–3526
- [28] Wiersma A T, Gaines T A, Preston C, Hamilton J P, Giacomini D, Buell C R, Leach J E, Westra P. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*[J]. Planta, 2015, 241(2): 463–474
- [29] Varanasi V K, Godar A S, Currie R S, Dille A J, Thompson C R, Stahlman P W, Jugulam M. Field-evolved resistance to four modes of action of herbicides in a single kochia (*Kochia scoparia* L. Schrad.) population[J]. Pest Management Science, 2015, 71(9): 1207–1212
- [30] Lu H, Yu Q, Han H, Owen M J, Powles S B. Metribuzin resistance in a wild radish (*Raphanus raphanistrum*) population via both *psbA* gene mutation and enhanced metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(5): 1353–1359

Study on the Resistance Level and Mechanism of Different *Abutilon theophrasti* Populations to Atrazine in Hebei Province

GUO Qianying^{1,2} LI Zhe¹ MA Shujie² WANG Mingsi² YANG Juan^{1,*} ZHANG Lihui^{2,*}

(¹Hebei Key Laboratory of Crop Stress Biology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004;

²College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: In order to clarify the resistance level and mechanism of *Abutilon theophrasti* to atrazine in corn field, whole-plant assay was used to evaluate the resistant level of six *A. theophrasti* populations collected from different areas of Hebei Province to atrazine in this study. Non-target-site resistance (NTSR) mechanism was studied through determining the activities of the detoxification metabolizing enzymes glutathione-S-transferases (GSTs) and cytochrome P450 oxidases (P450s) in *A. theophrasti* with Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. In addition, sequence alignment and expression assay were conducted on the target gene *psbA*. The results showed that HB-3 population was susceptible to atrazine with GR₅₀ value of 1 662. 75 g·hm⁻², while HB-6 population showed a high level of resistance with GR₅₀ value of 84 721. 13 g·hm⁻² and resistance index (RI) of 50. 95. GSTs inhibitor NBD-Cl and P450s inhibitor malathion could increase the toxicity of atrazine to the resistant population (R) HB-6, the GR₅₀ values was decreased by 11. 61 times (GSTs) and 27. 77 times (P450s), respectively. Besides, GSTs and P450s activities of R population were higher than those of S population. No mutation was detected on the Ser-264 amino acid site of *psbA* gene in R population. Furthermore, the expression of *psbA* gene in the R population was lower than that of in the S population after treatment with atrazine. To the best of our knowledge, it was the first report that the resistance of *A. theophrasti* to atrazine was caused by the enhanced detoxification metabolism mediated by GSTs and P450s, which laid a theoretical foundation for the scientific control of *A. theophrasti* and the reduced application of atrazine.

Keywords: *Abutilon theophrasti*, atrazine, GSTs, P450s, resistance

ISSN 1000-8551



9 771000 855235

05>