



吴群, 韦建国, 郭嘉颖, 等. 反枝苋对氟磺胺草醚的抗性水平及分子机制[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(5): 873-879.

WU Qun, WEI Jianguo, GUO Jiaying, et al. Resistance level and molecular mechanism of *Amaranthus retroflexus* L. to fomesafen[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(5): 873-879.

反枝苋对氟磺胺草醚的抗性水平及分子机制

吴群, 韦建国, 郭嘉颖, 张战战, 冯致科, 陈金奕*

(南京农业大学除草剂毒理与抗药性实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: [目的] 本研究旨在明确黑龙江省大豆田反枝苋 (*Amaranthus retroflexus* L.) 种群对氟磺胺草醚的抗药性水平, 并研究其产生抗性及其抗性的分子机制。 [方法] 利用琼脂法快速测定采自黑龙江省嫩江县的 3 个反枝苋种群对氟磺胺草醚的抗性水平。通过盆栽法筛选出抗氟磺胺草醚/噻吩磺隆的反枝苋植株, 并进行原卟啉原氧化酶 (protoporphyrinogen IX oxidase, PPO) 和乙酰乳酸合酶 (acetolactate synthase, ALS) 的靶标基因测序。 [结果] 相比于敏感种群, 黑龙江省 3 个种群对氟磺胺草醚的相对抗性指数 (resistance index, RI) 分别为 83.6、83.8 和 93.4; 位于反枝苋 PPO2 高度保守区域编码 128 位氨基酸的核苷酸由 AGG 突变为 GGG, 导致精氨酸被替换为甘氨酸 (Arg-128-Gly)。3 个抗氟磺胺草醚的反枝苋种群均对 ALS 抑制剂类除草剂产生多抗性。对 *als* 基因测序后发现, 与敏感种群相比, 各抗性种群 10 个单株的 ALS 保守区域均发生多个不同位点 (Ala-205-Val、Asp-376-Glu、Trp-574-Leu 和 Ser-653-Thr) 及组合的氨基酸取代方式, 各种群突变位点和杂合度多样。 [结论] PPO2 的 Arg-128-Gly 氨基酸取代可能是黑龙江 3 个反枝苋种群对氟磺胺草醚产生抗性的主要原因, 3 个种群同时对 ALS 抑制剂类除草剂存在靶标位点突变导致的多抗性。

关键词: 反枝苋; 氟磺胺草醚; PPO; ALS; 突变

中图分类号: S482.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)05-0873-07

Resistance level and molecular mechanism of *Amaranthus retroflexus* L. to fomesafen

WU Qun, WEI Jianguo, GUO Jiaying, ZHANG Zhanzhan, FENG Zhike, CHEN Jinyi*

(Laboratory of Herbicide Toxicology and Resistance, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] The paper aimed to determine the resistance level of *Amaranthus retroflexus* L. populations to fomesafen collected from soybean fields in Heilongjiang Province, and to study the molecular mechanism of fomesafen resistance and multiple resistance. [Methods] Three populations from Nenjiang County in Heilongjiang Province were evaluated for resistance level to fomesafen by agar-based rapid bioassay. The plants that survived fomesafen or thifensulfuron-methyl treatment in pots at the field recommend dose were supposed to be the resistant ones, and their full-length sequences of protoporphyrinogen IX oxidase genes and acetolactate synthase gene were sequenced. [Results] Compared with the sensitive population, the relative resistance index (RI) of the three populations to fomesafen were 83.6, 83.8 and 93.4, respectively. It was found that the nucleotides encoding amino acids at 128 in the highly conserved PPO2 region were mutated from AGG to GGG, resulting in the substitution of arginine to glycine (Arg-128-Gly). Additionally, all three populations exhibited multiple resistance to ALS inhibitors. The *als* gene sequencing showed that single or combined amino acid substitutions at multiple sites (Ala-205-Val, Asp-376-Glu, Trp-574-Leu, and Ser-653-Thr) occurred in the ALS conserved region of the three resistant populations, with a diverse heterozygosity. [Conclusions] Arg-128-Gly amino acid substitution of PPO2 might be the main resistance mechanism of *A. retroflexus* L. populations to fomesafen. All the three *A. retroflexus* L. populations showed multiple resistance to ALS inhibitors, and the resistance mechanism was mainly due to target site ALS mutations.

Keywords: *Amaranthus retroflexus* L.; fomesafen; PPO; ALS; mutation

反枝苋 (*Amaranthus retroflexus* L.) 别名西风谷、野苋菜、人苋菜, 1 年生草本, 雌雄同株, 自花授粉, 染色体 $2n=34$ 。反枝苋原产于北美洲, 于 1905 年入侵我国, 目前各省市均有分布^[1]。反枝苋适应性强, 作为一种伴人植物, 可随作物种子、水流、风、有机肥、牲畜粪便以及鸟类等传播。反枝苋入侵农田, 与作物竞争光、水、肥, 侵占地上部分, 2019 年反枝苋在呼伦贝尔市发生面积 26.76 hm^2 , 成害面积 9.33 hm^2 , 造成作物

收稿日期: 2023-06-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1400503)

* 通信作者: 陈金奕, 副教授, 研究方向为除草剂生物测定与杂草抗药性机制, E-mail: 2021072@njau.edu.cn。

减产^[2]。我国东北是重要的粮食产地,是大豆和玉米的主产区,而反枝苋是大豆、玉米等旱田常见的杂草。氟磺胺草醚以及噻吩磺隆分别是大豆、玉米田防除反枝苋的常见除草剂。

氟磺胺草醚是由英国帝国化学工业有限公司推出的一种二苯醚类除草剂。1998年浙江嘉华化工有限公司推出的氟磺胺草醚水剂在我国登记使用,主要用于花生、玉米、大豆等旱田作物的阔叶类杂草防除,对于禾本科杂草也具有一定的抑制作用^[3]。氟磺胺草醚的作用靶标为原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen IX oxidase, PPO), PPO是四吡咯生物合成途径中高度保守的膜结合酶家族,是叶绿素和血红素生物合成的关键酶^[4-5]。原卟啉原IX氧化酶由核基因编码,具有2种亚型,分别是PPO1和PPO2;其中PPO1由 $ppx1$ 编码,定位于叶绿体膜上;PPO2由 $ppx2$ 编码,位于线粒体膜上^[6]。在一些原核生物和植物中, $ppx2$ 可以双重靶向叶绿体和线粒体^[7]。以二苯醚类为代表的PPO抑制剂杀草谱广、药效高、作用速度快、低毒、土壤残留期短。除二苯醚类除草剂外,我国普遍使用的PPO抑制剂还包括N-苯基-恶二唑酮类(N-phenyl-oxadiazolones)如恶草酮, N-苯基酰亚胺类(N-phenyl-imides)如丙炔氟草胺, N-苯基-三唑啉酮类(N-phenyl-triazolinones)如唑草酮等除草剂。

除了PPO抑制剂除草剂外,乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase, ALS)抑制剂是另一类大豆田防除禾本科和阔叶杂草的主要除草剂类别。主要品种有噻吩磺隆、咪唑乙烟酸、唑啶磺草胺等,自20世纪80年代在我国大豆田广泛应用^[8]。靶标酶ALS是由细胞核基因编码的定位于叶绿体的酶,由Umbarger等^[9]在大肠杆菌中发现,是催化支链氨基酸生物合成途径中的第1种酶,催化2分子丙酮酸缩合形成乙酰乳酸。

随着除草剂的重复、广泛使用,杂草种群在除草剂的选择压下不断被筛选,产生抗药性进化。杂草对除草剂的抗性机制分为靶标位点抗性和非靶标位点抗性。靶标位点抗性可以通过基因突变引起氨基酸改变,影响靶标酶结构,从而阻止或改变酶催化中心与除草剂的结合;还可以通过靶标酶基因的过表达,产生超过除草剂正常剂量结合范围的靶标酶^[10]。非靶标位点抗性泛指除靶标位点抗药性之外的所有抗性机制。除草剂抗性行动委员会统计报道了全球范围内15种杂草(11种双子叶杂草、4种单子叶杂草)对PPO抑制剂产生抗性;而多达172种杂草(105种双子叶杂草、67种单子叶杂草)对ALS抑制剂产生抗性^[11]。现已发现多种靶标位点突变赋予杂草对PPO抑制剂的抗性,包括PPO2中Gly-210氨基酸缺失^[12], PPO2中Arg-128-Gly/Met、Gly-399-Ala和Val-361-Ala氨基酸取代^[13-15],以及PPO1中Ala-212-Thr的取代^[16]。杂草对ALS抑制剂除草剂的抗性在国内外发展很快,现已报道了位于ALS的5个高度保守区的9个突变位点与抗药性的发生密切相关:Ala-122、Pro-197、Ala-205、Phe-206、Asp-376、Arg-377、Trp-574、Ser-653和Gly-654^[17]。

反枝苋作为恶性杂草,已对多种不同作用机制的除草剂产生抗性,包括光系统II(photosystem complex II, PS II)抑制剂、ALS抑制剂、PPO抑制剂、羟基苯基丙酮酸双氧化酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)抑制剂和草甘膦等^[11]。与其他苋属杂草相比,反枝苋是最早发展出抗性的杂草之一^[18-19]。2016年,我国首次报道了黑龙江反枝苋对氟磺胺草醚的抗性^[20]。同时,反枝苋对噻吩磺隆、唑啶磺隆、咪唑乙烟酸等ALS抑制剂已产生高水平抗性^[21]。本文旨在明确我国黑龙江省嫩江县大豆田反枝苋对氟磺胺草醚的抗性水平,研究抗性的分子机制,探究多抗性情况及机制,为田间抗性反枝苋的科学治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

反枝苋无用药史敏感种群采自江苏省连云港市赣榆区种群,待测种群采自黑龙江省嫩江县,种群详细信息见表1。250 g·L⁻¹氟磺胺草醚水剂购于吉林省八达农药有限公司,25%噻吩磺隆可湿性粉剂购于安徽丰乐农化有限责任公司。

1.2 反枝苋对氟磺胺草醚的抗药性水平测定

在直径9 cm的培养皿中垫2层滤纸,添加6 mL蒸馏水。将待测反枝苋种群播入培养皿中,在人工气候培养箱中进行培养(温度30℃/25℃,光照/黑暗培养时间12 h/12 h)。3 d后选取整齐露白(露白部分长度约为5 mm)的种子待测。

根据预试验结果,确定氟磺胺草醚的浓度梯度:敏感种群为0、0.06、0.13、0.25、0.50和1.00 μmol·L⁻¹;

抗性种群为0、1、5、10、20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。配制氟磺胺草醚4 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液并按比例稀释,将稀释后的药液按照1:100(体积比)与10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的热琼脂溶液混合,倒入10 $\text{cm}\times 10\text{ cm}$ 的方形培养皿中(每皿40 mL),得到含测试浓度药剂的琼脂板,室温冷却凝固待用。将各种群整齐露白的种子线性均匀排列在含不同浓度药剂的琼脂板上(每皿12颗,每个浓度4个重复),加盖,用塑料膜封闭。在人工气候培养箱中进行培养(温度28 $^{\circ}\text{C}/23\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照/黑暗培养时间12 h/12 h)。7 d后测量并记录各皿中反枝苋的芽长,计算芽长抑制率。

表1 供试反枝苋种群信息

Table 1 Information of *Amaranthus retroflexus* L. populations in this study

种群名称 Population	采集地点 Collection site	年份 Year	用药史 History of herbicide application
S	江苏省赣榆区徐山小学西 West of Xushan Primary School, Ganyu District, Jiangsu Province	2018	路边采集的无用药史种群 Roadside collection, without herbicide usage
R1	黑龙江省黑河市嫩江县第二管理区 Heilongjiang Heihe City Nenjiang County second administrative district	2017	田间采集,用药史不详 Field collection, herbicide history unknown
R2	黑龙江省黑河市嫩江县第四管理区 Heilongjiang Heihe City Nenjiang County fourth administrative district	2017	田间采集,用药史不详 Field collection, herbicide history unknown
R3	黑龙江省黑河市嫩江县第六管理区 Heilongjiang Heihe City Nenjiang County sixth administrative district	2017	田间采集,用药史不详 Field collection, herbicide history unknown

1.3 反枝苋原卟啉原氧化酶基因测序及突变分析

1.3.1 测序材料 将黄土与基质(江苏兴农基质科技公司)按照1:2(质量比)混合的营养土(pH6.3,有机质含量11 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)填入7 $\text{cm}\times 7\text{ cm}\times 8\text{ cm}$ 的塑料盆钵,将待测种群的反枝苋种子均匀播在土中,置于温室培养。培养条件:白天(30 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$,夜间(20 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 。待植物长至2~3叶期间苗,定株至每盆8株;长至4叶期时,各抗性种群用3WP-2000行走式喷雾塔(农业农村部南京农业机械化研究所,其圆盘直径为50 cm ,喷头孔径为0.3 mm ,喷雾压力为0.3 MPa ,雾滴直径为100 μm ,喷头流量为90 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,喷液距离1 340 mm),按照喷雾体积30 mL 、喷液面积0.469 m^2 ,喷施田间推荐有效成分剂量450 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的氟磺胺草醚,对照植株喷施清水。施药后21 d,黑龙江各种群植株与对照相比,仅少量植株枯死,存活植株正常生长。取存活状态较好的反枝苋叶片幼嫩组织,各抗性种群取样8株,敏感种群的清水对照取样8株,单株分装并于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.2 RNA提取与cDNA合成 用球磨仪将上述样品在液氮条件下研磨成细粉,用总RNA提取试剂盒(DP419,天根生化科技有限公司)按步骤对样品进行总RNA提取。提取的抗性植株RNA样品浓度为114.7~771.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,敏感植株样品浓度为553.36~2 186.76 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,经琼脂糖凝胶电泳检测后发现RNA基本无降解。对提取的RNA样品进行反转录,第1链互补DNA(cDNA)按照HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)(Vazyme, R312-01)合成。各样品的cDNA合成后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.3.3 靶标基因扩增及测序 使用已报道的2对引物ppx1-F/ppx1-R和ppx2-F/ppx2-R分别对反枝苋ppx1和ppx2基因进行扩增,引物由擎科生物科技有限公司合成,引物信息见表2。聚合酶链式反应(PCR)在Applied Biosystems[™]热循环仪(Thermo Fisher Scientific)中进行,PCR终反应量为50 μL ,PCR反应条件:5 μL cDNA、各引物2 μL 、25 μL 2 \times T5 Super PCR Mix(擎科生物科技有限公司)和16 μL 无酶

表2 反枝苋基因的扩增引物

Table 2 Primers for *A. retroflexus* L. target gene amplification

引物名称 Primers	序列(5'→3') Sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	引物用途 Target gene	参考文献 Reference
ppx1-F/ppx1-R	CTCCGACATCTCGTTCC/ ACCCTCTATACACCTCCC	58	扩增ppx1近全长基因(约1 555 bp) Amplification of nearly full-length ppx1 gene (about 1 555 bp)	[22]
ppx2-F/ppx2-R	GGTACCATGGAATTCAATCCATTAC/ TCTAGATTATGCGGTCTTCTCATTC	58	扩增ppx2全长基因(1 608 bp) Amplification of ppx2 full-length gene (1 608 bp)	[23]
als-F/als-R	CCGGATCCATGGCGTCCACTTCTTCAAAC/ GGCCCCGGCTAATAAGCCCTTCTCCATCA	65	扩增als全长基因(2 010 bp) Amplification of als full-length gene (2 010 bp)	[24]

水。PCR 反应程序:95 °C 5 min;95 °C 15 s,58 °C 15 s,72 °C 1 min,循环 35 次;72 °C 5 min。PCR 扩增产物由擎科生物科技有限公司进行测序。使用 SnapGene 6.0.2 以及 Chromas 软件,对测序结果进行比对和分析。

1.4 反枝苋乙酰乳酸合酶基因测序及突变分析

1.4.1 测序材料 同 1.3.1 节,噻吩磺隆田间推荐有效成分剂量为 30 g·hm⁻²。每个种群取样 10 株,单株分装并于-80 °C 冰箱保存。

1.4.2 DNA 提取 用球磨仪将上述样品研磨成细粉,用 CTAB 法提取 DNA。

1.4.3 靶标基因扩增及测序 使用 *als-F/als-R* 引物(表 2)进行扩增,PCR 终反应量为 40 μL,PCR 反应条件:1 μL DNA、各引物 2 μL、20 μL 2 × Rapid Taq Master Mix(诺唯赞生物科技有限公司)和 15 μL 无酶水。PCR 反应程序:95 °C 5 min;95 °C 15 s,62 °C 15 s,72 °C 75 s,循环 35 次;72 °C 5 min。产物测序和分析同 1.3.3 节。

1.5 数据统计

使用 Image J 图像处理软件测定植株芽长,芽长抑制率=(1-处理芽长/对照芽长)×100%。

使用 SigmaPlot 14.0 软件进行数据分析,选用 Log-Logistic 三参数模型拟合,方程: $y = a / [1 + (\frac{x}{GR_{50}})^b]$ 。

式中: x 为除草剂剂量(μmol·L⁻¹); y 为芽长抑制率; b 为斜率; a 为芽长抑制率的上限。根据不同反枝苋种群的 GR₅₀ 值计算相对抗性倍数(resistance index, RI),RI=抗性种群 GR₅₀/敏感性种群 GR₅₀。

2 结果与分析

2.1 琼脂法测定不同反枝苋种群对氟磺胺草醚的抗性水平

与敏感种群相比,具有用药史的 3 个反枝苋种群均对氟磺胺草醚表现出高水平抗性。由图 1 可见,随着药剂浓度的增加,反枝苋的芽生长抑制逐渐增强。江苏敏感种群 S 在 1 μmol·L⁻¹ 氟磺胺草醚处理下芽生长被完全抑制;而黑龙江抗性种群 R3 在 1 μmol·L⁻¹ 氟磺胺草醚处理下芽生长几乎不受影响,40 μmol·L⁻¹ 时芽生长被完全抑制(图 1)。剂量响应曲线(图 2)结果显示,敏感种群的 GR₅₀ 值为 0.1 μmol·L⁻¹,远低于各抗性种群的 GR₅₀ 值(8.36~9.34 μmol·L⁻¹);黑龙江 3 个反枝苋种群对氟磺胺草醚抗性水平相似,RI 为 83.6~93.4(表 3)。

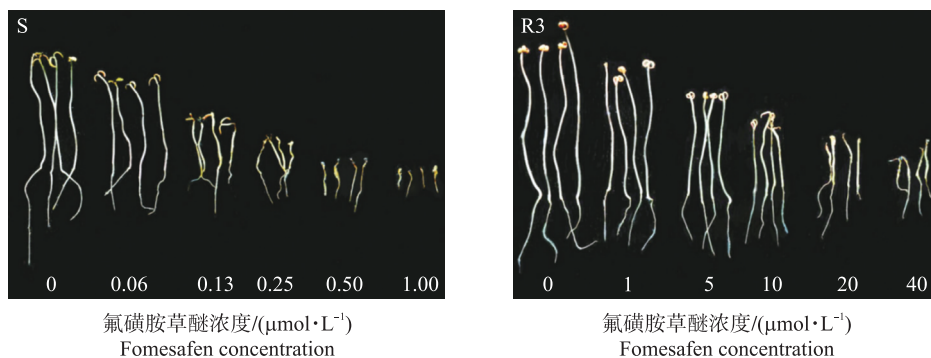


图 1 琼脂法测定敏感 S 与抗性反枝苋代表种群 R3 对氟磺胺草醚的浓度响应

Fig. 1 The dose response of sensitive population S and resistant *A. retroflexus* L. population R3 to fomesafen by agar-based bioassay

表 3 不同反枝苋种群对氟磺胺草醚的剂量响应曲线拟合参数及抗性水平

Table 3 Parameters of dose-response curves and resistance levels of *A. retroflexus* L. populations to fomesafen

种群名称 Population	回归参数 Regression parameter			抑制中浓度 50% growth reduction (GR ₅₀)	相对抗性倍数 Resistance index (RI)
	a	b	r		
S	102.48±2.12	1.66±0.61	0.968 8	0.10±0.03	1.0
R1	99.58±3.20	0.98±0.11	0.996 6	8.36±0.98	83.6
R2	99.85±2.08	0.62±0.04	0.998 3	8.38±0.86	83.8
R3	98.87±2.75	1.04±0.10	0.997 3	9.34±0.91	93.4

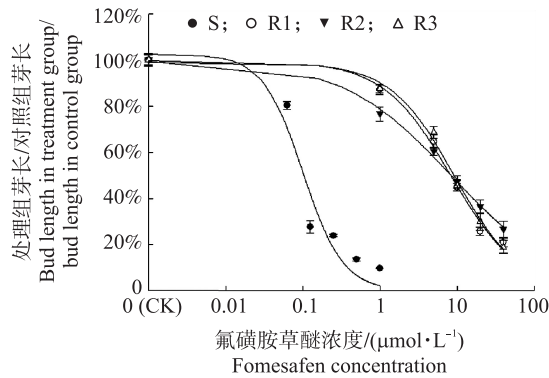


图 2 氟磺胺草醚处理反枝苋种群的浓度响应曲线

Fig. 2 Dose response curves of fomesafen treatment in the *A. retroflexus* L. populations

2.2 反枝苋 *ppx1* 和 *ppx2* 基因序列分析

比对敏感和抗性反枝苋种群的 *ppx1* 基因序列后未发现已报道的抗性相关 Ala-212-Thr 突变;将敏感种群基因 *ppx2*(*ppx2*-S)与反枝苋抗性种群基因(*ppx2*-R)进行比对后发现,抗性种群存在 1 个 A 到 G 的单碱基突变,导致 128 位点的精氨酸被甘氨酸取代(Arg-128-Gly)。各抗性种群测序的 8 个单株均发生此突变,突变频率达 100%。此外,测序峰图显示各个抗性种群该位点均为单峰(图 3),表明该基因为纯合突变。

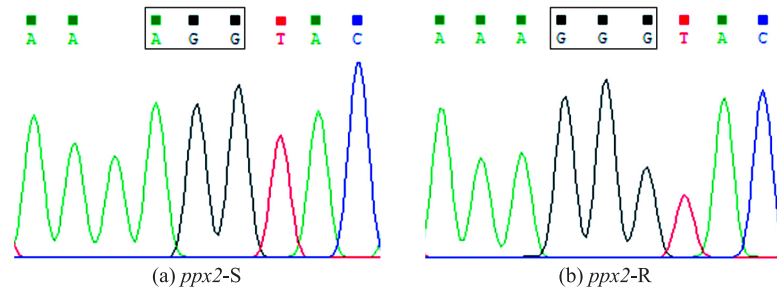


图 3 反枝苋种群 *ppx2* 基因部分测序图谱

Fig. 3 Partial sequencing chromatography of *ppx2* in *A. retroflexus* L. populations codon of Gly-128

红框部分为编码取代位点 128 位氨基酸的碱基。The red box is the base encoding the 128-position amino acid at the substitution site.

2.3 反枝苋 *als* 基因序列分析

将反枝苋敏感种群与抗性种群 *als* 基因测序结果进行比对发现,各抗性种群的 10 个测序单株均含有靶标位点突变,R1、R2 和 R3 种群分别存在 6、5 和 2 种突变类型(表 4)。从氨基酸取代方式的发生频率来看,测序的 30 个抗性单株中,574 位的 Trp 被 Leu 取代发生频率最高,占总数的 83%;其次为 653 的 Ser 被

表 4 黑龙江反枝苋抗性种群 *als* 突变信息

Table 4 Mutations in *als* in resistant *A. retroflexus* L. populations from Heilongjiang

种群 Population	突变位点 Mutation site	取代氨基酸 Amino acids substituted	突变株数/总测序株数 Number of mutant plants/total number of plants sequenced
R1	TGG-574-TTG	Trp-574-Leu	2/10
	TGG-574-TGG/TTG	Trp-574-Trp/Leu	1/10
	AGC-653-ACC	Ser-653-Thr	2/10
	GCT-205-GCT/GTT, TGG-574-TGG/TTG	Ala-205-Ala/Val, Trp-574-Trp/Leu	1/10
	GCT-205-GCT/GTT, AGC-653-AGC/ACC	Ala-205-Ala/Val, Ser-653-Ser/Thr	1/10
	TGG-574-TGG/TTG, AGC-653-AGC/ACC	Trp-574-Trp/Leu, Ser-653-Ser/Thr	3/10
R2	GCT-205-GTT	Ala-205-Val	1/10
	GAT-376-GAA	Asp-376-Glu	1/10
	TGG-574-TTG	Trp-574-Leu	6/10
	TGG-574-TGG/TTG	Trp-574-Trp/Leu	1/10
R3	GCT-205-GCT/GTT, TGG-574-TGG/TTG	Ala-205-Ala/Val, Trp-574-Trp/Leu	1/10
	TGG-574-TTG	Trp-574-Leu	9/10
	TGG-574-TGG/TTG, AGC-653-AGC/ACC	Trp-574-Trp/Leu, Ser-653-Ser/Thr	1/10

Thr 取代,以及 205 位点的 Ala 被 Val 取代;376 位点 Asp 被 Glu 取代发现频率相对最低,仅在 R2 的 1 个单株中存在。从突变的杂合性来看,测序结果主要分为 3 种类型:纯合取代 (Ala-205-Val、Asp-376-Glu、Trp-574-Leu 和 Ser-653-Thr) 共 21 株,杂合取代 (Trp-574-Trp/Leu) 共 2 株,双杂合取代 (205+574、205+653 和 574+653) 共 7 株。其中,含有 Trp-574-Leu 纯合突变的植株达 17 株,占总测序单株的 50% 以上。

3 结论与讨论

本研究通过琼脂法快速测定 4 个反枝苋种群对氟磺胺草醚的抗药性水平。结果表明,相对于江苏敏感种群,3 个采自黑龙江省嫩江地区的反枝苋种群均对 PPO 抑制剂氟磺胺草醚产生了高水平抗性 (RI = 83.6~93.4)。该结果与我国学者采用整株生物测定法测得的抗性结果^[20,25]相似。对氟磺胺草醚的靶标酶基因 *ppx1* 及 *ppx2* 进行扩增和测序后发现,与敏感种群的 8 个单株相比,3 个抗性种群的共 24 株反枝苋编码 PPO2 蛋白 128 位氨基酸的核苷酸均发生 AGG 到 GGG 的纯合突变,导致精氨酸被甘氨酸取代。Arg-128 位点是 PPO2 蛋白的保守催化区^[26],Arg-98-Gly 被认为与 Arg-128-Gly 突变同源,其差异在于 30 个氨基酸的靶向/信号肽是否属于蛋白质的 N 端^[27]。Arg-128-Gly 的氨基酸替换不仅赋予其他反枝苋种群抗药性,还导致长芒苋 (*A. palmeri* S. Watson) 对 PPO 抑制剂的抗性^[13,28-29]。高度一致的靶标位点抗性机制与种群间接近的相对抗性倍数结果相对应,由此推测 3 个抗性种群存在差异显著的非靶标抗性机制的可能性较低。另外,Huang 等^[23]在 2020 年报道了另一个采自嫩江地区的 PPO 抑制剂抗性反枝苋种群,20 个抗性植株中有 16 株为 128 突变杂合子,4 株为纯合子。相比于该种群,本研究中的 3 个抗性种群明显具有更高的抗性进化程度。

ALS 抑制剂单剂量筛选及测序结果表明,抗氟磺胺草醚的反枝苋种群对噻吩磺隆存在多抗性,且抗性植株的靶标基因突变频率为 100%,包含多个已知与抗性相关的纯合或双杂合突变位点。根据相关报道,3 个抗性反枝苋种群中所发现的多种突变类型可对 ALS 抑制剂中几乎所有化学结构类别产生抗药性^[11]。这种高频率多位点组合的突变方式在我国所报道的反枝苋种群中罕见^[24,30]。该结果表明,供试的 3 个黑龙江反枝苋种群不仅对 PPO 抑制剂除草剂抗性进化严重,而且 ALS 抑制剂除草剂的多抗性发展严重。因此,对于黑龙江抗性反枝苋种群的综合治理迫在眉睫。

琼脂法因其价格及人力资源成本低、占用空间小且检测速度快等优点,已应用于多种作用机制的除草剂抗性检测。例如,González-Torralva 等^[31]使用琼脂法测定长芒苋对氟乐灵的抗性;陈金奕等^[32]用琼脂法测定了黑龙江反枝苋种群对咪唑乙烟酸的抗性水平;Messelhäuser 等^[33]建立了琼脂法测定大穗看麦娘 (*Alopecurus myosuroides* Huds.) 对环庚草醚和氟噻草胺抗药性;澳洲杂草科学家使用琼脂法有效测定了硬直黑麦草 (*Lolium rigidum* Gaud.) 对精异丙甲草胺、氟乐灵、烯禾啶等一系列不同作用机制除草剂的抗药性^[34]。本研究首次用琼脂法成功快速检测了反枝苋对 PPO 抑制剂除草剂的抗性水平,该方法将为苋属杂草对 PPO 抑制剂除草剂的抗性快速检测提供技术指导和支撑。

参考文献 References:

- [1] Qin Z, Zhang J E, Jiang Y P, et al. Invasion process and potential spread of *Amaranthus retroflexus* in China [J]. *Weed Research*, 2018, 58(1): 57-67.
- [2] 石家兴, 陈申宽. 大豆田杂草反枝苋的危害情况调查与治理对策 [J]. 呼伦贝尔学院学报, 2022, 30(1): 119-122.
Shi J X, Chen S K. Investigation and control measures of *Amaranthus retroflexus* L. in soybean field [J]. *Journal of Hulunbuir University*, 2022, 30(1): 119-122 (in Chinese with English abstract).
- [3] 王成, 牛建泽, 刘建龙. 氟磺胺草醚在大豆田上的除草效果试验 [J]. 现代化农业, 2000(1): 7-8.
Wang C, Niu J Z, Liu J L. Experimental study on herbicidal effect of fomesafen soybean field [J]. *Modern Agriculture*, 2000(1): 7-8 (in Chinese).
- [4] Arnould S, Takahashi M, Camadro J M. Acylation stabilizes a protease-resistant conformation of protoporphyrinogen oxidase, the molecular target of diphenyl ether-type herbicides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14825-14830.
- [5] Hao G F, Zuo Y, Yang S G, et al. Protoporphyrinogen oxidase inhibitor: an ideal target for herbicide discovery [J]. *Chimia*, 2011, 65(12): 961-969.
- [6] Lermontova I, Kruse E, Mock H P, et al. Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8895-8900.
- [7] Watanabe N, Che F S, Iwano M, et al. Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 20474-20481.

- [8] 孙倩倩,郑道田,朱天山,等. 大豆-玉米带状复合种植田土壤处理除草剂筛选及田间应用效果评价[J]. 东北农业大学学报,2023,54(11):1-14.
Sun Q Q,Zheng D T,Zhu T S, et al. Screening of pre-emergence herbicides and evaluation of field efficacy in soybean-maize strip intercropping system[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2023,54(11):1-14(in Chinese with English abstract).
- [9] Umberger H E,Brown B. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry,1958,233(5):1156-1160.
- [10] Powles S B,Yu Q. Evolution in action:plants resistant to herbicides[J]. Annual Review of Plant Biology,2010,61(1):317-347.
- [11] Heap,I. The International Herbicide-Resistant Weed Database[EB/OL]. [2023-06-05]. <https://www.weedscience.org>.
- [12] Patzoldt W L,Hager A G,McCormick J S,et al. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(33):12329-12334.
- [13] Giacomini D A,Umphres A M,Nie H,et al. Two new *PPX2* mutations associated with resistance to PPO-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri*[J]. Pest Management Science,2017,73(8):1559-1563.
- [14] Rangani G,Salas-Perez R A,Aponte R A,et al. A novel single-site mutation in the catalytic domain of protoporphyrinogen oxidase IX (PPO) confers resistance to PPO-inhibiting herbicides[J]. Frontiers in Plant Science,2019,10:568.
- [15] Nie H,Harre N T,Young B G. A new V361A mutation in *Amaranthus palmeri* *PPX2* associated with PPO-inhibiting herbicide resistance[J]. Plants,2023,12(9):1886.
- [16] Bi B,Wang Q,Coleman J J,et al. A novel mutation A212T in chloroplast protoporphyrinogen oxidase(*PPO1*) confers resistance to PPO inhibitor Oxadiazon in *Eleusine indica*[J]. Pest Management Science,2020,76(5):1786-1794.
- [17] Fang J,Yang D,Zhao Z,et al. A novel Phe-206-Leu mutation in acetolactate synthase confers resistance to penoxsulam in barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*(L.)P. Beauv)[J]. Pest Management Science,2022,78(6):2560-2570.
- [18] Warwick S I,Weaver S E. Atrazine resistance in *Amaranthus retroflexus*(redroot pigweed)and *A. powellii*(green pigweed)from Southern Ontario[J]. Canadian Journal of Plant Science,1980,60(4):1485-1488.
- [19] Ferguson G M,Hamill A,Tardif F. ALS inhibitor resistance in populations of powell amaranth and redroot pigweed[J]. Weed Science,2001,49:448-453.
- [20] 滕春红,崔书芳,谭洪鹤,等. 黑龙江省大豆田反枝苋对氟磺胺草醚的抗药性[J]. 农药,2016,55(5):380-383.
Teng C H,Cui S F,Tan H H,et al. Resistance of *Amaranth retroflexus* L. to fomesafen in soybean fields of Heilongjiang Province[J]. Pesticide,2016,55(5):380-383(in Chinese with English abstract).
- [21] Huang Z,Huang H,Chen J,et al. Nicosulfuron-resistant *Amaranthus retroflexus* L. in Northeast China[J]. Crop Protection,2019,122:79-83.
- [22] Du L,Li X,Jiang X,et al. Target-site basis for fomesafen resistance in redroot pigweed(*Amaranthus retroflexus*)from China[J]. Weed Science,2021,69(3):290-299.
- [23] Huang Z,Cui H,Wang C,et al. Investigation of resistance mechanism to fomesafen in *Amaranthus retroflexus* L. [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2020,165:104560.
- [24] Huang Z,Chen J,Zhang C,et al. Target-site basis for resistance to imazethapyr in redroot amaranth(*Amaranthus retroflexus* L.)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2016,128:10-15.
- [25] Wang H,Wang H,Zhao N,et al. Multiple resistance to PPO and ALS inhibitors in redroot pigweed(*Amaranthus retroflexus*) [J]. Weed Science,2020,68(1):19-26.
- [26] Hao G F,Tan Y,Yu N X,et al. Structure-activity relationships of diphenyl-ether as protoporphyrinogen oxidase inhibitors: insights from computational simulations[J]. Journal of Computer-Aided Molecular Design,2011,25(3):213-222.
- [27] Jones E A L,Andres R J,Dunne J C,et al. Confirmation and detection of novel acetolactate synthase- and protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicide-resistant redroot pigweed(*Amaranthus retroflexus*)populations in North Carolina[J]. Weed Science,2023,71(2):84-94.
- [28] Cao Y,Huang H,Wei S,et al. Target gene mutation and enhanced metabolism confer fomesafen resistance in an *Amaranthus retroflexus* L. population from China[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2022,188:105256.
- [29] Varanasi V K,Brabham C,Norsworthy J K,et al. A statewide survey of PPO-inhibitor resistance and the prevalent target-site mechanisms in Palmer amaranth(*Amaranthus palmeri*)accessions from Arkansas[J]. Weed Science,2018,66(2):149-158.
- [30] Cao Y,Wei S,Huang H,et al. Target-site mutation and enhanced metabolism confer resistance to thifensulfuron-methyl in a multiple-resistant redroot pigweed(*Amaranthus retroflexus*)population[J]. Weed Science,2021,69(2):161-166.
- [31] González-Torralva F,Norsworthy J K. Understanding resistance mechanisms to trifluralin in an Arkansas Palmer amaranth population[J]. Genes,2021,12(8):1225.
- [32] 陈金奕,张朝贤,黄红娟,等. 反枝苋对咪唑乙烟酸抗性水平及分子机制[J]. 植物保护,2015,41(2):130-134.
Chen J Y,Zhang C X,Huang H J,et al. Levels and molecular mechanisms of resistance of *Amaranth retroflexus* to imazethapyr[J]. Journal of Plant Protection,2015,41(2):130-134(in Chinese with English abstract).
- [33] Messelhäuser M H,Linn A I,Mathes A,et al. Development of an agar bioassay sensitivity test in *Alopecurus myosuroides* for the pre-emergence herbicides cinnamylin and flufenacet;7[J]. Agronomy,2021,11(7):1408.
- [34] Chen J,Yu Q,Owen M,et al. Dinitroaniline herbicide resistance in a multiple-resistant *Lolium rigidum* population[J]. Pest Management Science,2018,74(4):925-932.