

看麦娘对甲基二磺隆靶标抗性的快速检测

郭文磊², 白霜¹, 池艳艳², 冯莉², 王金信^{*1}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; 2. 广东省农业科学院植物保护研究所/
广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要: 甲基二磺隆是防除小麦田看麦娘 *Alopecurus aequalis* 等禾本科杂草的主要除草剂品种之一, 但目前中国山东、江苏及安徽等地已有部分看麦娘种群对其产生了抗性。ALS 基因 197 位点突变是看麦娘对甲基二磺隆产生抗性的重要机理, 根据突变型和野生型看麦娘在 197 位点处碱基序列的不同, 本研究设计出了一种衍生性酶切扩增多态性序列 (dCAPS) 分子标记方法, 可用于 197 位点突变的快速检测。通过在引物 D197F 序列的 3' 端引入一个错配碱基, 扩增所得不同种群看麦娘的 ALS 片段经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后表现出多态性: 野生敏感型分别产生了 200 和 36 bp 的 2 个条带; 纯合突变型因无法被切开, 只有 236 bp 的一个条带; 而杂合突变型则同时产生了上述 3 个条带。该 dCAPS 检测结果准确、可靠, 与经典的整株水平测定结果一致, 并且可同时检测 197 位点上任一形式的突变。研究结果可为看麦娘等禾本科杂草对甲基二磺隆靶标抗性的快速检测提供理论依据。

关键词: 看麦娘; 甲基二磺隆; 靶标抗性; ALS 基因; 突变; dCAPS

中图分类号: S482.4; S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)02-0178-07

Rapid detection of target-site resistance to mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis*

GUO Wenlei², BAI Shuang¹, CHI Yanyan², FENG Li², WANG Jinxin^{*1}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China;
2. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Mesosulfuron-methyl is a widely used herbicide for the control of *Alopecurus aequalis* and some other grass weeds in wheat fields. However, some *A. aequalis* populations have evolved resistance to mesosulfuron-methyl in Shandong, Jiangsu and Anhui Province, China. The ALS gene mutation, which occurred at 197 codon, is an important mechanism causing mesosulfuron-methyl resistance in *A. aequalis*. Basing on the different base sequences between the wild and mutant type, a derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) method was designed for rapid detection of the ALS gene mutation at 197 codon. A mismatched base was introduced at 3'-end of the primer D197F. Then the ALS fragments amplified from different *A. aequalis* plants showed polymorphisms after digested by the

收稿日期: 2018-01-13; 录用日期: 2018-03-09.

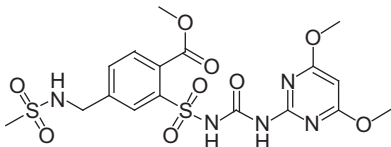
基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772181, 31471787); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303031).

作者简介: 郭文磊, 男, 博士, 主要从事农田杂草抗药性及防控技术研究, E-mail: nongzhida@126.com; *王金信, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 教授, 主要从事农药毒理与应用研究, E-mail: wangjx@sdau.edu.cn

restriction enzyme *Bam*H I. The wild plants ultimately produced two fragments (36 bp and 200 bp). The homozygous mutant plants couldn't be digested and only produced a 236 bp fragment. While the heterozygous mutant plants produced three aforementioned fragments at the same time. The results obtained using the dCAPS method were accurate and reliable, which were consistent with the classical whole-plant experiments. Moreover, it could detect any mutations at ALS 197 codon. This study provides a theoretical basis for the rapid detection of target-site resistance to mesosulfuron-methyl in *A. aequalis* and other grass weeds.

Keywords: *Alopecurus aequalis*; mesosulfuron-methyl; target resistance; ALS gene; mutation; dCAPS

看麦娘 *Alopecurus aequalis* 是一种常见禾本科杂草, 广泛分布于中国华东、中南、西南及黄河流域等部分地区, 在长江中下游地区为害严重, 主要为害小麦、油菜等夏收作物。磺酰胺类除草剂甲基二磺隆 (mesosulfuron-methyl, 图式 1) 是目前防除小麦田杂草的主要除草剂品种之一, 尤其被广泛用于防除已对精噁唑禾草灵产生抗性的禾本科杂草。甲基二磺隆通过抑制杂草体内乙酰乳酸合成酶 (ALS) 的活性, 导致其支链氨基酸合成受阻, 从而影响蛋白质的合成而造成杂草死亡^[1]。



图式 1 甲基二磺隆结构式

Scheme 1 Structural formula of mesosulfuron-methyl

研究表明, ALS 抑制剂类除草剂非常容易导致杂草抗药性的产生^[2]。截至目前, 全球范围内已报道 160 种杂草对该类除草剂产生了抗性^[3], 在中国, 看麦娘、日本看麦娘 *A. japonicus* 及蔺草 *Beckmannia syzigachne* 等小麦田杂草已对甲基二磺隆产生了抗性^[3-6]。靶标位点突变是最常见的 ALS 抑制剂类除草剂抗性机理, 目前在 ALS 酶的 122、197、205、376、377、574、653、654 等 8 个氨基酸位点上已发现 28 种抗性突变形式, 其中涉及 197 位点的突变多达 13 种^[7]。不同的突变位点通常可导致杂草对不同类别 ALS 抑制剂类除草剂产生交互抗性^[8]; 反之, 连续使用某种 ALS 抑制剂类除草剂防治杂草, 抗性种群中最终保留下来的突变位点也会呈现出一定的规律性^[9]。这为针对性地设计抗性分子检测方法提供了可能。检索有关甲基二磺隆抗性的报道, 发现 ALS 基因突变均是杂草对其产生抗性的重要机理, 且均为 197

位点或 574 位点的突变, 如关于日本看麦娘, Bi 等报道了 P197T、W574L 2 种突变^[5, 10], 关于蔺草, Li 等报道了 P197S 突变^[6], 关于看麦娘则目前共报道了 P197R、P197S、P197T 和 W574L 4 种突变^[11-13]。

田间杂草种群对除草剂抗性的产生是一个逐渐演化的过程, 若能在抗性产生的早期准确进行检测, 则有助于采取措施减缓抗性的蔓延, 提高防除效果。目前常用的抗性检测方法主要有整株盆栽法^[14]、培养皿法^[15]、基因测序法^[16]及衍生性酶切扩增多态性序列 (derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS) 分子标记法^[17]等。其中, 整株盆栽法和培养皿法可针对不同类型抗性机制进行检测, 其检测结果与田间实际情况较为相符, 但需提前采集种子, 无法实现当季检测, 且整株盆栽法需要可靠的喷雾设备并会占用大量的温室空间; 基因测序法检测结果准确, 可一次性检测多个突变位点, 还可检测出未知的新突变, 但该方法费用相对较高, 且需对测序结果进行专业的生物信息学分析; dCAPS 方法只能针对已知的突变位点进行检测, 且只能专一性地检测一个突变位点, 但该方法可在田间杂草幼苗期进行当季检测, 其操作简单, 检测结果直观, 检测周期短, 可实现高通量检测。笔者等前期已报道了抗甲基二磺隆看麦娘种群 ALS 574 位点突变的 dCAPS 分子标记^[4], 本研究针对另一常见的甲基二磺隆抗性突变位点 197 位点设计了 dCAPS 分子标记, 以期在甲基二磺隆抗性愈发突出的形势下, 为其快速检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

针对看麦娘 ALS 197 位点目前共报道了 P197R、P197S 及 P197T 3 种突变形式, 本研究选取课题组先前报道的分别含 P197R 和 P197S 突变的 AHSX-5^[12]

和 SDTC-4^[13]种群, 以及含 P197T 突变的 JSHX-1 种群 (未报道) 为研究材料, 以已报道的野生敏感

种群 HNX-1^[4]作为对照。看麦娘种群采集点具体信息见表 1。

表 1 看麦娘种群采集点信息

Table 1 The collection site of *A. aequalis* populations

种群编号 Population number	ALS 突变类型 ALS mutation	采集地点 Collection site	经纬度 Longitude/latitude	采集时间 Time
AHSX-5	P197R	安徽省寿县炎刘镇圣井村 Shengjin village, Yanliu town, Shou county of Anhui	116.89°E/32.09°N	2013.6
JSHX-1	P197T	江苏省盱眙马坝镇石桥村 Shiqiao village, Maba town, Xuyi county of Jiangsu	118.77°E/33.00°N	2014.6
SDTC-4	P197S	山东省郯城县归昌乡归昌三村 Guichang third village, Guichang town, Tancheng county of Shandong	118.28°E/34.51°N	2014.6
HNX-1	-	河南省息县孙庙乡何营村 Heying village, Sunmiao town, Xi county of Henan	114.70°E/32.33°N	2013.6

供试药剂: 30 g/L 的甲基二磺隆 (mesosulfuron-methyl) 可分散油悬浮剂 (OF), 拜耳作物科学有限公司; 2 × 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶液 (自配): 20 g/L CTAB, 100 mmol/L (pH 8.0) Tris-HCl, 20 mmol/L (pH 8.0) 乙二胺四乙酸 (EDTA), 1.4 mol/L 氯化钠及 10 g/L 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP); 限制性内切酶 *Bam*H I, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 50 × TAE 缓冲液 (使用时稀释至 1 ×) 及溴化乙锭染色液, 北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器设备: T100 Thermal cycler PCR 仪, 美国伯乐公司; ChampGel 6000 紫外凝胶成像系统, 北京赛智创业科技有限公司; JY300C 型电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; OSE-Y20 型电动组织研磨器、TGear 微型离心机及 OSE-96 型干式恒温金属浴, 天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 甲基二磺隆单剂量测定 采用整株法^[4]。看麦娘种子催芽及幼苗培养方法同文献中。每种群处理 30 株, 3~4 叶期时施药, 喷液量 450 L/hm², 甲基二磺隆有效成分用量为 9 g/hm², 以 HNX-1 作为种群对照, 清水处理为空白对照。于药剂处理后 21 d 观察记录各种群看麦娘生长情况: 若生长良好, 与对照无明显差异, 则标记为高抗性 (RR) 植株; 若生长明显受到抑制但能够存活, 且有新叶长出, 则标记为中等抗性 (RS) 植株; 若植株表现出萎蔫、脱水及干枯死亡等症状, 则标记为敏感 (SS) 植株^[18-19]。

1.2.2 ALS 基因片段测序 因所扩增的基因片段无内含子, 故直接采用总 DNA 作为模板进行扩增。在各抗性种群中, 选取经甲基二磺隆单剂量

处理后存活的植株进行 DNA 提取及克隆测序, 以验证各抗性种群中是否确含上述突变。看麦娘总 DNA 提取、扩增及测序过程中所需引物 (含 PCR 引物 AL-F1、AL-R1 及测序引物 AL-F2、AL-F3)、PCR 反应条件、PCR 反应体系及测序方法均同文献^[13]。

1.2.3 ALS 197 位点 dCAPS 检测分析 dCAPS 方法是通过在抗性突变位点附近人为引入酶切位点, 使酶切电泳图谱具有多态性, 从而判断某一特定位点是否存在碱基突变, 该过程包含 PCR 扩增、限制性酶切及电泳 3 个基本步骤^[17]。本研究中用于 dCAPS 分析的看麦娘基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[20]。

由于抗性看麦娘 ALS 197 位点上已报道 3 种突变形式, 针对每种突变形式设计 dCAPS 分子标记较为繁琐, 因此本研究针对野生型看麦娘 ALS 197 位点序列进行设计, 利用 dCAPS 在线设计工具 dCAPS Finder 2.0^[21]及常规引物设计软件 Primer Premier 5.0, 设计出一对引物 D197F 和 D197R (表 2)。通过在引物 D197F 序列的 3' 端引入一个错配碱基, 扩增所得不同种群看麦娘的 ALS 片段经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后表现出多态性: 野生型看麦娘 ALS 片段被完全酶切, 从而含有 36 和 200 bp 的 2 个片段; 纯合突变型看麦娘无法被酶切, 只有 236 bp 的 1 个片段; 而杂合突变型看麦娘则同时含有 36、200 及 236 bp 的 3 个片段。

除引物外, dCAPS 检测分析中 PCR 扩增的反应体系及反应条件均同文献^[13], 但因片段较短, 延伸时间设置为 30 s, 反应循环数为 36 个。酶切反应体系共 20 μL, 含 3 μL PCR 产物、1 μL 限制性内切酶、2 μL 10 × Buffer 及 14 μL 灭菌水。限

表 2 用于看麦娘 ALS 197 位点 dCAPS 分析的引物信息

Table 2 Primers used for dCAPS in ALS 197 codon of *A. aequalis*

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	目标氨基酸位点 Target codon	退火温度 T _m /°C	酶识别位点 Enzyme recognition site	预计酶切后片段大小 Expected fragment size/bp	
					野生型 Wild	突变型 Mutant
D197F	CTCGACTCCATCCCSATGGTCGCY ATCACGGGRCAGGAT	Pro197, <u>CCC</u>	60.1	<i>Bam</i> H I, G/GATCC	200, 36	236
D197R	ATCTGCTGCTGGATGTCCTTGGG					

注: 引物中加粗显示的碱基表示人为设计的错配以引入 *Bam*H I 酶切位点; 限制性内切酶识别的碱基在引物和目标氨基酸位点中用下划线标出。

Note: Base in bold in the primer sequence was modified from the ALS gene sequence to create a recognition site for the restriction enzyme *Bam*H I. Bases belonging to the enzyme restriction site were underlined in the primer sequence and in the target codon sequence.

制性内切酶 *Bam*H I 反应温度为 30 °C, 酶切时间均为 30 min。待酶切反应完成后, 向体系中加入 2 μL 10 × Loading Buffer (随酶附赠), 混匀, 取 10 μL 至 2.5% 的琼脂糖凝胶, 在 1 × TAE 电泳缓冲液中、120 V 电压下电泳 35 min。电泳结束后将凝胶在溴化乙锭水溶液中染色 10min, 通过紫外凝胶成像系统观察并拍照。每个抗性种群随机选取 15 株进行 dCAPS 检测分析, 以 HNX-1 种群作为野生型对照。将 dCAPS 检测与整株法得到的结果进行卡方检验, 以验证两种方法对甲基二磺隆抗性看麦娘的检测结果是否具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 甲基二磺隆单剂量测定结果

施药后 21 d, 清水对照组各种群看麦娘生长良好, 甲基二磺隆处理组不同种群植株存活数及生长状态略有不同。由表 3 可知, 野生型种群 HNX-1 对甲基二磺隆仍十分敏感, 9 g/hm² 剂量处理时完全死亡; 而 AHSX-5、JSHX-1 及 SDTC-4 种群中均含有较高比例的甲基二磺隆抗性植株, 但不同种群间 RR、RS 和 SS 型植株所占比例存在一定差异, 说明不同的抗性种群其抗性机理可能不同, 或处于不同的抗性进化阶段。

表 3 不同种群看麦娘对甲基二磺隆敏感性单剂量 (有效成分 9 g/hm²) 测定结果Table 3 Sensitivity of different *A. aequalis* populations to mesosulfuron-methyl at single dose (9 g a.i./hm²)

种群编号 Population number	RR		RS		SS	
	株数 Plant number	比例 Ratio/%	株数 Plant number	比例 Ratio/%	株数 Plant number	比例 Ratio/%
AHSX-5	12	40	17	56.7	1	3.3
JSHX-1	9	30	21	70	0	0
SDTC-4	18	60	12	40	0	0
HNX-1	0	0	0	0	30	100

注: RR, 高抗性植株; RS, 中等抗性植株; SS, 敏感型植株。

Note: RR, highly resistant plants; RS, moderately resistant plants; SS, susceptible plants.

2.2 ALS 基因片段测序

测序结果表明, 扩增所得 ALS 基因片段长度为 1 860 bp, 编码 619 个氨基酸, 与预期结果一致。经过 BLAST 比对分析, 所扩增片段序列与 Genbank 登记的看麦娘 ALS 序列 (LC200800.1)、大穗看麦娘 ALS 序列 (AJ437300.2) 及茵草 ALS 序列 (KR809881.1) 同源性分别在 99%、96% 和 97% 左右, 证明所扩增的片段即为目标片段。

就 3 个抗性和野生敏感种群 ALS 片段序列进行比对, 发现种群 AHSX-5、JSHX-1 和 SDTC-4 的抗性植株中分别存在 P197R (CCC-CGC)、P197T (CCC-ACC) 及 P197S (CCC-TCC) 3 种氨基

酸突变形式, 且在其他已知的突变位点处均未产生突变 (图 1)。

2.3 看麦娘 ALS 基因 197 位点 dCAPS 检测分析

本研究针对野生型 ALS 基因设计酶切位点, 从而使扩增的野生型 ALS 基因片段能够被限制性内切酶特异性切割。在引物 D197F 中引入一个错配碱基, 使得野生型 ALS 基因片段在 197 位点处形成了一个 *Bam*H I 的酶切位点 (GGATCC)。

以看麦娘基因组 DNA 为模板, 引物 D197F/D197R 在突变型和野生型植株中均扩增得到一条 236 bp 的片段, 与预期结果相符。将 PCR 产物用限制性内切酶 *Bam*H I 进行酶切, 在电

泳图谱上, 野生型分别产生了 200 和 36 bp 的两个条带, 纯合突变型因无法被切开, 只有 236 bp 的一个条带, 而杂合突变型则同时产生了上述 3 个条带, 但因 36 bp 的条带太短, 无法在电泳图谱上清晰显示 (图 2)。

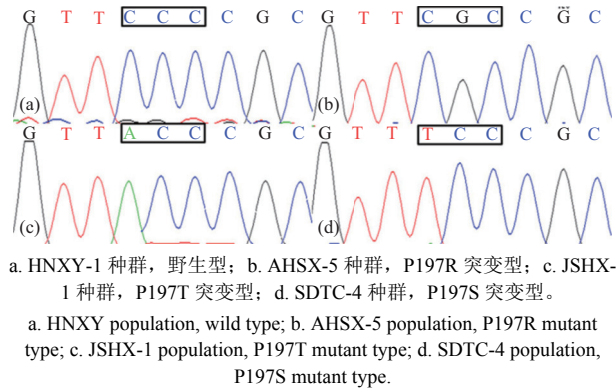
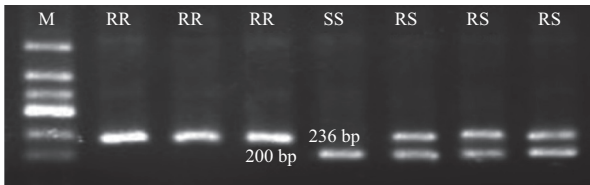


图 1 不同种群看麦娘 ALS 基因 197 位点测序峰图

Fig. 1 Sequence chromatograms at ALS 197 codon of different *A. aequalis* populations



M: 50 bp DNA marker; RR: 高抗纯合突变植株, 分别取自 AHSX-5、JSHX-1 和 SDTC-4 种群; RS: 中抗杂合突变植株, 分别取自 AHSX-5、JSHX-1 和 SDTC-4 种群; SS: 野生敏感植株, 取自 HNXY-1 种群。

M: 50 bp DNA marker; RR: highly resistant homozygous mutant plants, from AHSX-5, JSHX-1 and SDTC-4 population respectively; RS: moderately resistant heterozygous mutant plants, from AHSX-5, JSHX-1 and SDTC-4 population respectively; SS: susceptible wild type plant, from HNXY-1 population.

图 2 看麦娘 ALS 基因 197 位点 *BamH* I 酶切电泳图

Fig. 2 The dCAPS profile for ALS 197 codon in *A. aequalis* population using *BamH* I

研究表明, 3 个种群甲基二磺隆抗性植株的 ALS 基因 197 位密码子均发生了突变, 虽然具体的突变碱基不同, 但均发生在 197 位密码子的前两个碱基上, 而这两个碱基均包含在 *BamH* I 的识别位点上, 因此只要 197 位密码子前两位碱基产生突变, 均可被该 dCAPS 分子标记检测到。对 AHSX-5 种群进行分析时, 所检测的 15 株中有 5 株为抗性纯合型, 9 株为抗性杂合型, 1 株为野生型; 而 JSHX-1 种群 15 株中有 4 株为抗性纯合型, 10 株为抗性杂合型, 1 株为野生型; SDTC-4 种群 15 株中有 8 株为抗性纯合型, 7 株为抗性杂

合型。经验证, 3 种 ALS 197 纯合突变型植株均表现为高抗性, 杂合突变型植株表现为中等抗性, 且不同抗性种群经 dCAPS 分析检测到的高抗及中等抗性植株比例与表 3 中整株水平测定结果无显著性差异 (表 4), 说明本研究设计的 dCAPS 分析方法可对甲基二磺隆抗性看麦娘 197 位点的突变进行准确可靠的检测。

表 4 dCAPS 分析与整株法对甲基二磺隆抗性看麦娘检测结果对比

Table 4 Comparison of dCAPS and whole-plant bioassay in the detection of mesosulfuron-methyl resistant in *A. aequalis*

种群编号 Population number	RR/RS		χ^2	P 值 P value
	dCAPS	整株法 Whole-plant bioassay		
AHSX-5	5/9	12/17	0.13	0.72
JSHX-1	4/10	9/21	0.20	0.65
SDTC-4	8/7	18/12	0.18	0.67

注: RR, 高抗性植株; RS, 中等抗性植株。整株法中 RR 和 RS 植株数同表 3。

Note: RR, highly resistant plants; RS, moderately resistant plants. The RR/RS plant numbers of whole-plant bioassay were the same with Table 3.

3 结论与讨论

自 2002 年上市以来, 甲基二磺隆的市场规模不断扩大, 2012 年销售额已达 2.9 亿美元, 居磺酰脲类除草剂产品首位^[2]。截至 2018 年 3 月, 甲基二磺隆相关制剂在中国的登记产品共有 48 个^[23]。然而, 使用面积和频次的增长也带来了极高的抗性风险, 尤其是在当前杂草对精噁唑禾草灵抗性已较为普遍的前提下, 若其对甲基二磺隆也产生抗性, 则将可能导致小麦田抗性禾本科杂草面临无药可治的窘境^[24]。另外, 作为一种茎叶处理剂, 若因抗性问题导致杂草防治失败, 则后期有可能因杂草过大以及顾忌作物安全性等而很难采取补救措施, 从而导致严重的产量损失。

目前, 全球除草剂市场已有 20 多年未见新作用机制除草剂产生^[25], 如何延缓杂草对现有除草剂抗性的产生和发展, 延长药剂的市场周期已成为必须面对的问题, 而抗性检测是其中重要的一环。抗性杂草检测方法多样, 根据检测层次的不同, 可分为表型水平、生理生化水平和分子水平检测 3 大类^[26]。表型水平检测一般是指采用生物测定方法, 比较除草剂对抗性及敏感生物型植株的不同效果, 死亡率和生物量是最常用的检

测指标。该类方法简单易行、对不同抗性机制均可检测,但通常需要较大的温室空间,费时费力;另外,当杂草不同生物型对除草剂处理的反应差异不明显时,还需要人为进行评估,从而有可能影响结果的准确性和可重复性。生理生化水平检测一般是通过靶标酶和相关代谢酶活性进行测定,判断待测杂草靶标酶对除草剂敏感性是否降低、或代谢酶活性是否提高而甄别抗性,这类方法技术要求较高,有时需要放射性标记的底物。分子水平检测方法较多,不同的方法技术难度、精度要求及费用差别较大。其中,定量PCR、转录组测序对靶标和非靶标抗性机制均可检测,但设备昂贵、费用高,不适合田间种群的大量检测;常用的桑格测序法主要是针对靶标基因检测相关位点的突变,崔海兰等基于该方法实现了猪殃殃对ALS抑制剂靶标抗性的快速分子检测^[16],但该方法需要进行两次测序反应,测序结果需要专业软件进行生物信息学分析。

大量研究证明,ALS靶标位点突变是杂草对该类除草剂产生抗性的主要机制之一^[2,9]。虽然与ALS抑制剂类除草剂相关的突变位点多达8个,但具体到甲基二磺隆,则仅在197和574两个位点上产生了突变,其中197位点上共有3种突变形式。除dCAPS外,基于荧光标记单碱基延伸原理的SNaPshot技术^[27]以及等温扩增技术(LAMP)^[28]等也可用于已知突变的检测,但前者设备和试剂昂贵,后者设计方法复杂,因此目前这两种方法应用均较少。dCAPS检测技术的成本主要来源于限制性内切酶,而本研究选用的内切酶BamHI较为廉价,每个样品所需费用低于0.5元。Pan等报道了茵草ALS基因P197S突变的dCAPS分子标记^[29],可用于专一性检测P197S这一种突变,而本研究设计的dCAPS分子标记可检测197位点上任一形式的突变。另外由于ALS基因较为保守,看麦娘与日本看麦娘、茵草等杂草的ALS基因序列同源性极高,因此本研究中的dCAPS分子标记方法可能也适用于其他种类杂草抗性的检测,具体还有待进一步验证。

对田间杂草进行抗性检测不仅有利于减轻已有抗性杂草的危害,还有利于了解抗性产生的过程,对抗性风险进行预测,指导科学合理地使用除草剂,调整防治策略,防止抗性的大面积蔓延。本研究设计的dCAPS分子标记方法具有操作

简单、结果直观、价格低廉及可高通量检测等优点,并且可在田间直接采集叶片实现当季检测,结合本课题组设计的ALS基因574位点突变的dCAPS分子标记^[4],可实现看麦娘等杂草对甲基二磺隆等ALS抑制剂类除草剂靶标抗性的快速检测。然而,由于dCAPS方法只能针对已知的单个靶标位点突变进行检测,因此对于非靶标抗性及未知的新突变位点则还需要结合其他检测方法进行。

参考文献 (Reference):

- [1] MCCOURT J A, PANG S S, KING-SCOTT J, et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 569-573.
- [2] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 317-347.
- [3] HEAP I. The international survey of herbicide resistant weeds[DB/OL]. [2018-03-18]. <http://www.weedscience.org/Summary/Country.aspx?CountryID=9>.
- [4] GUO W L, YUAN G H, LIU W T, et al. Multiple resistance to ACCase and AHAS-inhibiting herbicides in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) from China[J]. Pestic Biochem Physiol, 2015, 124: 66-72.
- [5] 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.
- [6] LI L X, LIU W T, CHI Y C, et al. Molecular mechanism of mesosulfuron-methyl resistance in multiply-resistant American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne*)[J]. Weed Sci, 2015, 63(4): 781-787.
- [7] TRANEL P J, WRIGHT T R, HEAP I M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors[DB/OL]. [2018-03-18]. <http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>.
- [8] BECKIE H J, TARDIF F J. Herbicide cross resistance in weeds[J]. Crop Prot, 2012, 35: 15-28.
- [9] YU Q, POWLES S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding[J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(9): 1340-1350.
- [10] BI Y L, LIU W T, LI L X, et al. Molecular basis of resistance to mesosulfuron-methyl in Japanese foxtail, *Alopecurus japonicus*[J]. J Pestic Sci, 2013, 38(2): 74-77.
- [11] XIA W W, PAN L, LI J, et al. Molecular basis of ALS- and/or ACCase-inhibitor resistance in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.)[J]. Pestic Biochem Physiol, 2015, 122: 76-80.
- [12] GUO W L, LV L L, ZHANG L L, et al. Herbicides cross resistance of a multiple resistant short-awn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) population in wheat field[J]. Chil J Agric Res, 2016, 76(2): 163-169.
- [13] 郭文磊, 赵宁, 李伟, 等. 山东省小麦田看麦娘对甲基二磺隆的抗性及其基因突变[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(12): 1688-1694.

- GUO W L, ZHAO N, LI W, et al. Resistance of shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) to mesosulfuron-methyl in wheat fields in Shandong Province[J]. J Triticeae Crops, 2016, 36(12): 1688-1694.
- [14] BURGOS N R, TRANEL P J, STREIBIG J C, et al. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels[J]. Weed Sci, 2013, 61(1): 4-20.
- [15] KAUNDUN S S, HUTCHINGS S J, DALE R P, et al. Syngenta 'RISQ' test: a novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACCase and ALS inhibitor herbicides in grass weeds[J]. Weed Res, 2011, 51(3): 284-293.
- [16] 崔海兰, 王藏月, 徐林林, 等. 猪殃殃对 AHAS 抑制剂靶标抗性的快速分子检测[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 1049-1054.
- CUI H L, WANG C Y, XU L L, et al. Rapid molecular detection of the resistance of *Galium aparine* var. *tenerum* to AHAS inhibitors[J]. J Plant Prot, 2016, 43(6): 1049-1054.
- [17] KAUNDUN S S, WINDASS J D. Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds[J]. Weed Res, 2006, 46(1): 34-39.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19(1): 11-15.
- [21] NEFF M M, TURK E, KALISHMAN M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis[J]. Trends Genet, 2002, 18(12): 613-615.
- [22] DUHOUX A, PERNIN F, DESSERRE D, et al. Herbicide safeners decrease sensitivity to herbicides inhibiting acetolactate-synthase and likely activate non-target-site-based resistance pathways in the major grass weed *Lolium* sp. (rye-grass)[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1310.
- [23] 中国农药信息网. 农药登记数据[DB/OL]. [2018-03-18]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>.
China Pesticide Information Network. Data of pesticide registration[DB/OL]. [2018-03-18]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>.
- [24] 韩玉皎, 崔海兰, 李香菊. 我国冬小麦区苘草种群对甲基二磺隆的抗性水平[J]. 杂草科学, 2015, 33(2): 37-42.
- HAN Y J, CUI H L, LI X J. Survey of resistance levels to mesosulfuron-methyl in *Beckmannia syzigachne* (Steud.) Fernald populations in winter wheat fields in China[J]. Weed Sci, 2015, 33(2): 37-42.
- [25] DUKE S O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?[J]. Pest Manag Sci, 2012, 68(4): 508-512.
- [26] R4P Network. Trends and challenges in pesticide resistance detection[J]. Trends Plant Sci, 2016, 21(10): 834-853.
- [27] MARSHALL R, HANLEY S J, HULL R, et al. The presence of two different target-site resistance mechanisms in individual plants of *Alopecurus myosuroides* Huds., identified using a quick molecular test for the characterisation of six ALS and seven ACCase SNPs[J]. Pest Manag Sci, 2013, 69(6): 727-737.
- [28] PAN L, LI J, Zhang W N, et al. Detection of the I1781L mutation in fenoxaprop-*p*-ethyl-resistant American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.), based on the loop-mediated isothermal amplification method[J]. Pest Manag Sci, 2015, 71(1): 123-130.
- [29] PAN L, GAO H T, WU H, et al. Molecular basis of multiple resistance to herbicides inhibiting acetyl-CoA carboxylase and acetolactate synthase in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne*) from China[J]. Crop Pasture Sci, 2016, 67(11): 1208-1214.

(责任编辑: 唐 静)