

· 研究论文 ·

麦田猪殃殃对苯磺隆抗药性的快速检测

彭学岗, 王金信*, 吴翠霞, 段敏

(山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要:以采自山东、河南、安徽、陕西等地麦田及非农田的 10 个猪殃殃 *Galium aparine* 生物型为试材, 运用单剂量甄别技术对不同生物型对苯磺隆的抗药性进行了检测, 并以温室盆栽法及皿内抗性水平测定法验证其可靠性和可行性。结果表明: 在甄别剂量 (有效成分) 85 mg/L 下, 猪殃殃不同生物型萌发率存在显著性差异, 可以较好区分猪殃殃抗、感生物型; 温室盆栽法及皿内抗性水平测定法结果一致, 除采自山东泰安和陕西周至的麦田猪殃殃对苯磺隆仍处于敏感状态外, 其他 3 个地区麦田猪殃殃均产生了不同程度的抗药性, 且均与皿内单剂量甄别法结果一致, 表明皿内单剂量甄别法具有可靠性和可行性。

关键词:猪殃殃; 苯磺隆; 抗药性; 单剂量甄别

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2008)03-0311-04

A Quick-test for Detection of Herbicide Resistance to Tribenuron-methyl in *Galium aparine*

PENG Xue-gang, WANG Jin-xin*, WU Cui-xia, Duan Min

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: Ten biotypes of *Galium aparine* were sampled from Shandong, Henan, Anhui and Shaanxi Province. A single concentration discrimination method in Petri dish for detection of *Galium aparine* resistance to tribenuron-methyl was established and validated by greenhouse pot tests and Petri dish test. The results showed that a significant difference of germination rate between resistance and susceptible biotypes was obtained under the discrimination concentration, 85 mg (a.i.) / L of tribenuron-methyl. The resistance level tested by the Petri dish bioassay and greenhouse pot tests are in accordance with those of the single concentration discrimination method. The resistance of all the potential resistant biotypes to tribenuron-methyl, except those from Tai'an, Shandong Province, and Zhouzhi, Shaanxi Province was developed. The results suggested that this single concentration discrimination method is reliable and feasible.

Key words: *Galium aparine*; tribenuron-methyl; herbicide resistance; single concentration discrimination method

单一连续使用具有单一作用靶标的除草剂, 很容易使杂草对其产生抗药性。抗药性的产生给作物生产造成了严重威胁, 因此, 抗药性检测和监测工作日益迫切。Cirujeda 等^[1]改进了培养皿种

子检测法, 通过在琼脂培养基中加入赤霉素 GA_3 以打破种子休眠期, 实现了虞美人 *Papaver rhoeas* 对苯磺隆抗药性的快速检测鉴定。其他生理技术及其改进技术, 如分蘖测定法^[2]、茎切面再生苗

收稿日期: 2008-04-15; 修回日期: 2008-05-05.

作者简介: 彭学岗 (1983-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 从事除草剂抗药性研究, E-mail: xgp19830221@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 王金信 (1962-), 男, 山东胶南人, 理学博士, 教授, 从事除草剂毒理及应用技术研究. 联系电话: 0538-8241114; E-mail: wangjx@sdau.edu.cn

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAD08A09).

法^[3]、花粉粒萌发法^[4]等在杂草抗药性快速检测鉴定体系中也起到了重要作用。近年来,高通量筛选和聚合酶链式反应(PCR)技术在生理学、生物化学、分子生物学、遗传学、基因工程等领域获得了巨大成功,应用范围逐渐扩大,结合各种生理、生化和分子生物技术,为实现杂草抗药性的经济、快速、有效检测带来了契机^[5~8]。随着抗药性机理研究的深入以及各种技术的完善,探索构建一套经济、快速、有效的杂草抗药性检测鉴定体系具有重要的实践意义。

苯磺隆(tribenuron methyl)是一种重要的磺酰脲类麦田除草剂,具有成本低,除草效果好,对人、畜安全的特点,广泛用于冬小麦、春小麦、大麦和燕麦等麦类作物田,可有效防除一年生及多年生阔叶杂草。但由于该类除草剂作用位点单一,易产生抗药性,已成为其致命弱点。猪殃殃 *Galium aparine* 是茜草科猪殃殃属一年生或越年生植物,为北方冬麦区麦田杂草的优势种之一。然而,由于近年来单一连续使用苯磺隆,已发现猪殃殃对其产生了不同程度的抗药性。因此,建立一种快速检测猪殃殃对苯磺隆的抗药性的方法,对指导科学合理用药具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 供试药剂及试剂

75%苯磺隆水分散粒剂(tribenuron methyl WG),江苏健生生物农化有限公司;98%苯磺隆原粉,山东华阳科技股份有限公司;试剂均为分析纯。

1.2 供试杂草

10个猪殃殃 *Galium aparine* 生物型,采集地点及编号如下:山东泰安 1、2(TA1、TA2),河南许昌 1、2(XC1、XC2),河南漯河 1、2(LH1、LH2),安徽宿州 1、2(SZ1、SZ2),陕西周至 1、2(ZZ1、ZZ2),分别于2007年5月采自各地麦田及非农田(从未使用过除草剂),其中1为麦田生物型,2采自非农田。

1.3 试验方法

皿内单剂量甄别及抗性水平测定参照 Cirujeda等^[1]和 Durán-Prado等^[9]方法进行。选择敏感种群和麦田可能具有抗性种群的种子,用自来水清洗,30%次氯酸钠溶液表面消毒10 min,灭菌水洗3~5遍。消毒后的种子在无菌条件下播种在琼脂培养基上(含质量分数为1.3%的琼脂和2 g/L的硝酸钾)平板上,每皿30粒种子,4次重

复,于光照培养箱内培养。芽前培养温度15℃,不予光照;芽后白天20℃,黑夜15℃,每天10 h光照,光照强度 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在琼脂培养基中加入苯磺隆,有效成分含量(下同)分别为79、82、85、88、91 mg/L,以确定适宜的苯磺隆浓度作为区别抗性和敏感生物型的区别剂量。10 d后检查结果,以种子萌发率为指标;播种已催芽露白的种子,每皿10粒,以苯磺隆梯度浓度0.05、0.25、1.25、6.25、31.25 mg/L进行抗性水平测定,15 d后检查结果,测定主根长,计算抑制率,求回归方程。所有数据使用DPS软件处理。

采用温室盆栽法^[10]验证上述方法的可行性及可靠性。盆口面积 100 cm^2 ,播种已催芽露白的种子,每盆10粒,4次重复,置于温室内培养。温室温度白天为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$,夜间为 $15 \pm 5^\circ\text{C}$,相对湿度为75%±5%。待叶3~4轮,用3WT-型定量喷雾塔茎叶喷雾,梯度浓度(0.3125、0.625、1.25、5、10、20、40、80 g/hm²)处理。16 d后剪取杂草地上部分,称重,计算鲜重抑制率,使用DPS软件求出回归方程。

2 结果与分析

2.1 甄别剂量的确定

从表1可以看出,采自河南许昌的XC1随处理剂量的升高,萌发率呈下降趋势,然而整体变化不大,彼此间不存在显著性差异,而XC2随处理剂量的升高,萌发率急剧下降,差异性显著,苯磺隆处理剂量 $\geq 85 \text{ mg/L}$ 时萌发率为0,相同剂量下XC1、XC2生物型萌发率存在显著性差异;河南漯河和安徽宿州的结果与河南许昌趋势基本一致,各地1、2生物型在苯磺隆浓度为85 mg/L时萌发率存在较好的区分;而采自山东泰安、陕西周至的1、2生物型在所有处理剂量下均无区分,且萌发率均显著低于其他3个麦田生物型,因此,初步确定85 mg/L为甄别剂量,并假定山东泰安、陕西周至的麦田猪殃殃处于敏感状态。

2.2 皿内抗性水平测定对单剂量甄别法的验证

皿内抗性水平测定试验结果(见表2)表明,河南许昌、河南漯河、安徽宿州猪殃殃麦田生物型对苯磺隆已产生抗药性,抗性倍数分别为2.2、1.5和1.5;而山东泰安、陕西周至麦田生物型未见抗药性,为敏感种群。皿内抗性水平测定试验结果与单剂量甄别结果一致。

表 1 苯磺隆对猪殃殃的皿内单剂量试验结果

Table 1 The result of single dose of tribenuron-methy to Galium aparin by Petri dish test

地点 Site	生物型 Biotype	萌发率 Germination rate (%)				
		苯磺隆有效成分浓度				
		The concentration of tribenuron-methy, (a.i)/(mg/L)				
		79	82	85	88	91
河南许昌	XC1	55.3 ±6.8 a(a)	52.7 ±7.4 a(a)	51.3 ±9.0 a(a)	46.1 ±5.0 a(a)	31.6 ±7.4 b(a)
Henan Xuchang	XC2	4.0 ±2.7 a(b)	2.7 ±3.1 ab(b)	0 b(b)	0 b(b)	0 b(b)
河南漯河	LH1	89.5 ±4.3 a(a)	84.2 ±4.3 a(a)	81.6 ±6.8 a(a)	52.6 ±4.3 b(a)	31.6 ±7.4 c(a)
Henan Luohe	LH2	44.8 ±3.1 a(b)	38.2 ±6.6 a(b)	27.6 ±6.6 b(b)	14.5 ±2.7 c(b)	9.2 ±2.6 c(b)
山东泰安	TA1	18.5 ±3.1 a(a)	17.1 ±2.7 a(a)	11.8 ±2.7 b(a)	6.6 ±2.6 bc(a)	2.7 ±3.1 c(a)
Shandong Tai'an	TA2	17.1 ±2.7 a(a)	15.8 ±4.3 a(a)	14.5 ±5.1 a(a)	7.9 ±3.0 b(a)	2.6 ±3.1 b(a)
安徽宿州	SZ1	55.3 ±6.8 a(a)	52.7 ±7.4 a(a)	38.2 ±9.0 b(a)	26.3 ±4.3 c(a)	15.8 ±4.3 d(a)
Anhui Suzhou	SZ2	31.6 ±4.3 a(a)	21.1 ±4.3 b(b)	9.2 ±2.6 c(b)	0 d(b)	0 d(b)
陕西周至	ZZ1	18.5 ±3.1 a(a)	14.5 ±2.7 b(a)	11.8 ±2.7 b(a)	5.3 ±0 c(a)	2.7 ±3.1 c(a)
Shaanxi Zhouzhi	ZZ2	15.8 ±0 a(a)	14.5 ±5.1 a(a)	13.2 ±3.1 a(a)	7.9 ±3.0 b(a)	2.7 ±3.1 c(a)

注：1为猪殃殃潜在抗性生物型，采自麦田，2为敏感生物型，采自从未使用过除草剂的非农田，下同。表中同行数据(平均值±标准差)具有相同英文小写字母者表示在0.05水平差异不显著；括号内相同英文小写字母表示同一地区1、2生物型相同处理剂量时在0.05水平差异不显著(DMRT法)。

Note: 1 represents the biotype assumed as potential resistant from wheat field, and 2 represents the susceptible biotype from non-farming lands that never applied herbicides, Follows are the same. The data in the same row followed by the same letters show no significance at P < 0.05 by Duncan's multiple range test, while the the same letters in parentheses show no significance between 1 and 2 biotypes from the same region under the same concentration.

表 2 猪殃殃对苯磺隆抗药性水平的皿内测定结果

Table 2 The resistance level of Galium aparine to tribenuron-methy by Petri dish test

地点 Site	生物型 Biotype	回归方程 Regression equation	IC ₅₀ 值 (95% CL)/(μg/mL)	相关系数 Correlation coefficient	抗药性倍数 Resistance factor*
河南许昌	XC1	Y=5.0569+0.7080x	0.8311(0.2605~2.5186)	0.9800	2.2
Henan Xuchang	XC2	Y=5.5126+1.1902x	0.3709(0.2002~0.6285)	0.9906	
河南漯河	LH1	Y=5.1824+0.8004x	0.5917(0.2125~1.4848)	0.9834	1.5
Henan Luohe	LH2	Y=5.4680+1.1646x	0.3965(0.2078~0.6889)	0.9872	
山东泰安	TA1	Y=5.4445+0.6146x	0.1891(0.0710~0.4083)	0.9908	1.0
Shandong Tai'an	TA2	Y=5.6006+0.8339x	0.1905(0.4190~1.3618)	0.9828	
安徽宿州	SZ1	Y=5.2355+0.7949x	0.5055(0.2176~1.0736)	0.9888	1.5
Anhui Suzhou	SZ2	Y=5.6054+1.258x	0.3302(0.3206~0.7955)	0.9913	
陕西周至	ZZ1	Y=5.4446+0.8223x	0.2880(0.2063~0.3893)	0.9976	1.0
Shaanxi Zhouzhi	ZZ2	Y=5.5182+0.9228x	0.2744(0.1733~0.4092)	0.9962	

注：*生物型1的IC₅₀与当地生物型2的IC₅₀的比值。* The ratio of IC₅₀ of biotype 1 and 2.

2.3 温室盆栽法对单剂量甄别法的验证

温室盆栽法结果(见表3)表明,河南许昌、河南漯河、安徽宿州猪殃殃麦田生物型对苯磺隆已产生抗药性,抗性倍数分别为4.3、2.9和2.8;而山东泰安、陕西周至麦田生物型未见抗药性,为敏感种群。温室盆栽试验结果与单剂量甄别结果一致。

3 讨论

温室盆栽法作为检测杂草抗药性的常用方法,虽然能够提供杂草交互抗性或多抗性等方面的信息,指导轮换用药,但是劳动量大,费时长,不能及时快速反映农田杂草的抗药性情况。皿内抗性水平测定也是一种常用的杂草抗药性测定方法,虽与温室盆栽法相比更省时省力,然而要快速

表 3 猪殃殃对苯磺隆抗药性水平的温室盆栽法测定结果

Table 3 The resistance level of Galium aparine to tribenuron-methyl in pot test

地点 Site	生物型 Biotype	回归方程 Regression equation	GR ₅₀ (95% CL) / (μg/mL)	相关系数 Correlation coefficient	抗性倍数 Resistance factor*
河南许昌	XC1	Y=4.031 0+1.623 9x	3.950 9(1.949 5~14.207)	0.948 3	4.3
Henan Xuchang	XC2	Y=5.020 8+0.637 5x	0.927 7(0.230 8~3.549 3)	0.962 5	
河南漯河	LH1	Y=4.232 9+1.390 5x	3.562 0(1.886 9~10.231)	0.964 0	2.9
Henan Luohe	LH2	Y=4.942 3+0.610 7x	1.243 2(0.291 3~6.409 1)	0.960 1	
山东泰安	TA1	Y=4.947 4+0.654 2x	1.203 6(0.822 8~1.798 4)	0.992 8	1.1
Shandong Tai'an	TA2	Y=4.986 0+0.700 3x	1.047 2(0.749 3~1.469 3)	0.994 1	
安徽宿州	SZ1	Y=4.607 4+0.886 6x	2.772 5(0.993 1~18.308)	0.941 9	2.8
Anhui Suzhou	SZ2	Y=5.001 3+1.067 3x	0.997 2(0.440 9~2.250 6)	0.9617	
陕西周至	ZZ1	Y=5.016 6+1.455 7x	0.974 1(0.511 2~1.489 6)	0.964 9	0.9
Shaanxi Zhouzhi	ZZ2	Y=4.988 3+0.672 2x	1.041 0(0.807 4~1.344 9)	0.996 6	

注：*生物型 1 的 GR₅₀与当地生物型 2 的 GR₅₀的比值。* The ratio of GR₅₀ of biotype 1 and 2

实现大批量潜在抗药性生物型的抗性监测仍显困难。本文旨在建立一种麦田恶性杂草猪殃殃对苯磺隆的抗药性快速检测的皿内单剂量甄别法。

在确定甄别剂量时,一方面要使敏感生物型的萌发率尽量低;另一方面在保证敏感生物型萌发率低的前提下,抗药性生物型的萌发率尽可能高。综合考虑各地敏感种群的耐药性差异,本研究确定苯磺隆有效成分 85 mg/L 为甄别剂量。从培养皿抗性水平测定和温室盆栽法的结果可以看出,虽然供试猪殃殃的抗药性水平不高,温室盆栽法抗性倍数为 2.8~4.3 倍,培养皿抗性水平测定法的为 1.5~2.2 倍,但这两种常规方法得到的供试杂草猪殃殃对苯磺隆的抗药性趋势是一致的,且均与单剂量甄别法的结果相一致,表明皿内单剂量甄别法具有可靠性和可行性,在抗性水平较低时就可以很好区分抗、感生物型。

在皿内单剂量甄别检测出抗药性的基础上,结合皿内抗性水平测定,就可实现杂草抗药性的快速检测,从而克服皿内抗性水平测定和温室盆栽法劳动量大、费时长的缺点。然而此法也存在一定缺陷,即须同时获得麦田潜在抗药性生物型和敏感生物型,否则会影响到结果的可靠性,而敏感种群的获取有时存在困难。这种皿内单剂量甄别法的建立,结合皿内抗性水平测定,能够实现大批量供试猪殃殃对苯磺隆的抗药性的快速检测,对监测我国麦田恶性杂草猪殃殃对苯磺隆的抗药性和指导科学合理用药有着重要的现实意义,对建立快速检测和监测其他杂草抗药性的生物测定方法也具有借鉴意义。

参考文献:

[1] CIRUJEDA A, RECASENS J, TABERNER A, et al A Qualitative Quick-test for Detection of Herbicide Resistance to Tribenuron-methyl in Papaver rhoeas [J]. Weed Research, 2001, 41: 523-534.

[2] WANG Qing-ya (王庆亚), DONG Li-yao (董立尧), LOU Yuan-lai (娄远来), et al 农田杂草抗药性及其检测鉴定方法 [J]. Weed Science (杂草科学), 2002, (2): 1-5.

[3] BOUTSALIS P. Novartis Herbicide Quick-test New Anti-weed Resistance Tool from Novartis [C] //Proceedings 11th EWRS Symposium. Basel, Switzerland, 1999: 161.

[4] WANG Shu-feng (王树凤), XU Li-gen (徐礼根), MA Jian-yi (马建义), et al 除草剂生物筛选研究进展 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2002, 4(4): 3-9.

[5] LANDEGREN U. Laboratory Protocols for Mutation Detection. Oxford University Press [M]. USA: New York, 1996.

[6] PARSONS B L, HEFLICH R H. Genotypic Selection Methods for the Direct Analysis of Point Mutations [J]. Mutation Research, 1997, 387: 97-121.

[7] WAGNER J, HAAS H U, HURLE K. Identification of ALS Inhibitor-resistant Amaranthus Biotypes Using Polymerase Chain Reaction Amplification of Specific Alleles [J]. Weed Res, 2002, 42: 280-286.

[8] WANG G X, TAN M K, RAKSHIT S, et al Discovery of Single-nucleotide Mutations in Acetolactate Synthase Genes by EcoTilling [J]. Pestic Biochem Physiol, 2007, 88: 143-148.

[9] DURÁN-PRADO M, OSUNA M D, PRADO R D, et al Molecular Basis of Resistance to Sulfonylureas in Papaver rhoeas [J]. Pestic Biochem Physiol, 2004, 79: 10-17.

[10] FU Zhong-wen (付仲文), ZHANG Chao-xian (张朝贤), QIAN Yi-xin (钱益新), et al 几种抗药性杂草的检测方法 [J]. Plant Protection (植物保护), 1999, 25(4): 40-42.

(Ed JIN S H)