

· 专论与综述 ·

# 植物乙酰乳酸合成酶抑制剂 作用方式及机理研究进展

于澄宇\* , 何蓓如

(西北农林科技大学 农学院 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等植物为主要对象,系统评述了乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂在作用靶标、选择性机制、毒性机理及化学杀雄作用等方面的研究进展。ALS是磺酰脲类、咪唑啉酮类等多种除草剂的共同作用靶标,最新研究又发现苯磺隆、酰嘧磺隆等多种ALS抑制剂可作为敏感植物的化学杀雄剂。目前该研究领域的薄弱环节是ALS抑制剂的毒性机理,先后提出了支链氨基酸饥饿、核酸合成受阻、ALS底物积累、养分转运障碍、无氧呼吸等假说,但均未能被证实。借助高通量的代谢组学、转录组学、蛋白质组学检测技术将能够更全面地揭示ALS抑制剂的生理生化效应,为研究其毒性机理提供新证据。

**关键词:**乙酰乳酸合成酶;除草剂;化学杀雄剂;作用机理;植物毒性

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2011.03.02

中图分类号:S482.4;S481.1

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2011)03-0221-07

## Research progress on the mode and mechanism of action of plant acetolactate synthase inhibitors

YU Cheng-yu\* , HE Pei-ru

(College of Agronomy Northwest A & F University Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

**Abstract:** The research progress on the mechanism of chemicals inhibiting acetolactate synthase (ALS), including the target of inhibitors, selective mechanism, phytotoxicity mechanism, and gametocidal activity on cruciferous plants was summarized. ALS is the target of several herbicides, including sulfonylurea, imidazolinone, sulfonylamino-carbonyltriazolinone, triazolopyrimidine and pyrimidinylthio (or oxy)-benzoates. Recently, some ALS inhibiting-herbicides such as tribenuron-methyl and amidosulfuron were highlighted by their gametocidal activity on susceptible plant. However, the mechanism leading to phytotoxicity of ALS inhibitors is not understood. Some possible mechanisms including branched-amino acid starvation, repression of DNA synthesis, accumulation of ALS substrate, inhibition of photoassimilate translocation, anaerobic respiration etc. were hypothesized but no one was validated. In order to reveal new clues for study the phytotoxicity mechanism, more physiological and biochemical events in response to application of ALS inhibitors need to be discovered by using high-

收稿日期:2010-12-07;修回日期:2011-02-28.

作者简介:\* 于澄宇(1973-) 通讯作者(Author for correspondence), 陕西岐山人,博士,副研究员,主要从事植物化学杀雄研究,电话:029-87082845 E-mail: yu1009@nwsuaf.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(31071454);中央高校基本科研业务费专项(QN2009008);唐仲英育种基金(2009-51);陕西省自然科学基金(SJ08-ZT05).

throughput analytical methods including metabolomics, transcriptomics, and proteomics.

**Key words:** acetolactate synthase; herbicide; gametocide; mechanism of action; phytotoxicity

乙酰乳酸合成酶( acetolactate synthase ,ALS , EC4. 1. 3. 18) 或称作乙酰羟酸合成酶( acetoxy acid synthase ,AHAS) 是控制植物体内合成支链氨基酸( branched-chain amino acid ,BCAA ,包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸) 公共途径的关键酶,是磺酰脲类、咪唑啉酮类等多种高选择性、低毒化学除草剂的作用靶标<sup>[1-4]</sup>。笔者等研究发现一些 ALS 抑制型除草剂还可用作敏感植物的化学杀雄剂<sup>[5-8]</sup>,这一发现为 ALS 的研究开辟了新的领域。目前对于 ALS 作用机理方面的研究多集中于 ALS 与其抑制剂的相互作用、ALS 突变等环节,关于这些方面的进展已有详细综述<sup>[1-3]</sup>,但有关其毒性机理、化学杀雄作用等方面的研究报道很少。本文以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等植物为对象,主要围绕 ALS 抑制剂的作用靶标、作用方式、毒性机理、化学杀雄作用等几个方面进行了综合评述,以期为更好地开发新型、超高效 ALS 抑制剂提供新的思路和参考。

## 1 乙酰乳酸合成酶的代谢底物及其抑制剂类型

乙酰乳酸合成酶是以 2 分子丙酮酸为底物先合成乙酰乳酸,再转而合成缬氨酸和亮氨酸,或者以丙酮酸、2-丁酮酸为底物先合成乙酰羟酸,再逐步转变成异亮氨酸<sup>[1-4]</sup>。其酶活性的发挥主要依赖于辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸( FAD)、焦磷酸硫胺素 TPP( 或称 ThDP) 和二价阳离子如镁、锌、锰等。

由于动物体内不含有 ALS 酶,因此 ALS 抑制型除草剂对人畜比较安全。以 ALS 为靶标的抑制剂大致可以划分为 15 类,其中重要的结构主要有 5 类( 见图 1): 磺酰脲类( Sulfonyleureas , I )、咪唑啉酮类( Imidazolinones , II )、三唑嘧啶类( Triazolopyrimidines , III )、嘧啶水杨酸类 [Pyrimidinylthio ( or oxy )-benzoates , IV ]和磺酰胺基羰基三唑啉酮类( Sulfonyleamino-carbonyltriazolinones , V )等<sup>[1-4]</sup>。这

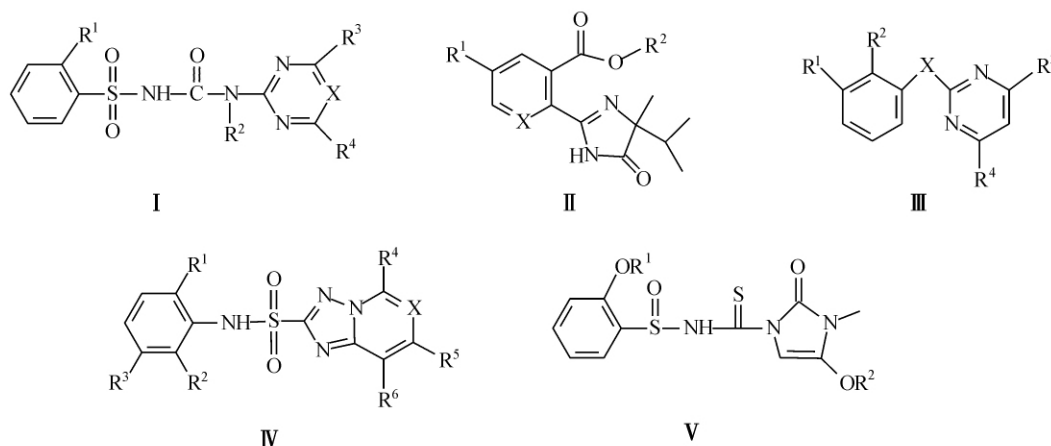


图 1 五类 ALS 抑制剂的基本结构

Fig. 1 Basic structure of five types of ALS-inhibiting herbicides

些除草剂均为内吸传导型,能被植物叶片和根系吸收,在分生组织内积累而使植物逐步死亡。植物典型的中毒症状为:叶片失绿、白化或变紫,节间缩短,顶芽死亡,最终全株死亡。

磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂是目前世界上使用量较大的两类除草剂。其中磺酰脲类除草剂品种很多,已成功应用的有近 30 多种,国内常用的主要有氯磺隆( chlorsulfuron)、甲磺隆( metsulfuron-methyl)、苯磺隆( tribenuron-methyl)、噻吩磺隆( thifensulfuron)、碘甲磺隆钠盐( iodosulfuron-methyl

sodium)、酰磺隆( amidosulfuron)、氯磺隆( chlorimuron-ethyl)、苄磺隆( bensulfuron-methyl)、吡磺隆( pyrazosulfuron-ethyl)、砒磺隆( rimsulfuron)、甲磺隆( sulfometuron-methyl)、单磺隆( monosulfuron)、烟磺隆( nicosulfuron)、啶磺隆( flazasulfuron)、胺苯磺隆( ethametsulfuron)、甲基二磺隆( mesosulfuron-methyl)、醚苯磺隆( triasulfuron)、氟唑磺隆( flucarbazone-sodium)等;咪唑啉酮类除草剂主要有咪唑乙烟酸( imazethapyr)、灭草喹( imazaquin)、咪唑烟酸( imazapyr)、甲基咪

唑烟酸(imazameth)、甲氧咪草烟(imazamox)等。迄今为止,世界各国仍在继续研发以ALS为靶标的新型除草剂<sup>[9]</sup>。传统的农药研发思路是先合成一系列的化合物,再通过生物活性测定筛选高活性的分子。随着分子生物学、结构化学、计算机化学等相关学科的发展,现在已可以采用基于农药数据库、虚拟受体结构分析及三维定量构效关系(3D-QSAR)等方法来合理设计新型ALS抑制剂<sup>[10]</sup>。

## 2 拟南芥乙酰乳酸合成酶与除草剂的相互作用模型

目前对于ALS与除草剂、辅酶等的相互作用模型已经分析得比较透彻<sup>[1-4]</sup>。对模式植物拟南芥的乙酰乳酸合成酶(AtALS)与除草剂的结晶复合物的研究表明:AtALS四聚体由4个相同亚基组

成<sup>[4]</sup>,与其他依赖焦磷酸硫胺素TPP的酶类似。AtALS每个亚基含3个结构域: $\alpha$ -domain(残基86~280)、 $\beta$ -domain(残基281~451)和 $\gamma$ -domain(残基463~639),再加一个C末端(648~668),环绕形成底物结合通道(图2A)<sup>[4]</sup>。AtALS与磺酰脲类除草剂形成复合物时,其C末端折叠与酵母ALS的结构类似<sup>[4]</sup>。磺酰脲、咪唑啉酮类除草剂与ALS结合后有部分重叠的亲和位点,它们通过与通道内部残基连接,阻塞ALS的代谢底物进入丙酮酸,以及进入活性位点而起到抑制酶活性的作用(图2B)<sup>[1-4]</sup>。这些发现为设计开发新除草剂提供了基础。

## 3 植物对ALS抑制剂的选择性形成机理

植物对除草剂具有选择性,这既是除草剂开发中必须考虑的因素,也是除草剂抗性研究的重要内

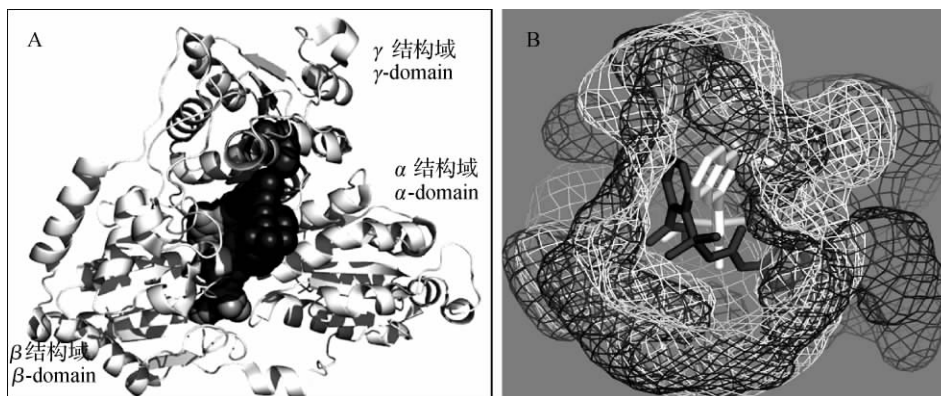


图2 AtALS亚基(A)及其与除草剂复合物(B)的结构示意图<sup>[1]</sup>

Fig. 2 Structure of AtALS subunit (A) and herbicides bind to AtALS (B)<sup>[1]</sup>

注:酶底物氯嘧磺隆、灭草唑及其结合通道分别用灰色、白色棒状模型和轮廓线表示。

Note: The substrate chlorimuron-ethyl and imazaquin and their access channel are shown as gray and white stick and mesh respectively.

容,更与除草剂的植物毒性(phytotoxicity)机理密切相关。植物对除草剂的选择性可能有以下几种形成方式。

### 3.1 除草剂吸收与转运上的差异

不同植物因叶面积、蜡质层<sup>[11]</sup>、气孔密度等因素而对除草剂的吸收存在差异。但也有些研究者认为,植物对磺酰脲类除草剂吸收率的差异,不足以解释耐药性差异高达千百倍的现象<sup>[12]</sup>。另外,植物对不同除草剂的转运能力不同,例如触杀型除草剂百草枯(paraquat)等只在药物接触部位起作用,不能彻底杀死杂草,而磺酰脲类等ALS抑制剂属内吸传导型,可通过导管传输至植物全身,从而彻底杀死杂草。

### 3.2 除草剂与酶靶标结合部位的差异

除草剂与ALS酶的结合部位及反应动力学差

异也会影响同种植物对不同化学结构除草剂的敏感性,例如磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂与ALS结合部位有差异,分别是ALS的非竞争性和反竞争性抑制剂<sup>[3]</sup>,其中磺酰脲类活性普遍较高<sup>[1]</sup>。

### 3.3 非靶标酶代谢解毒能力的差异

这是形成除草剂敏感性差异的重要原因之一。氟胺磺隆(triflurosulfuron methyl)在耐药的甜菜*Beta vulgaris*中的半衰期小于1h,而在敏感的甘蓝型油菜*Brassica napus*等植物体内的半衰期大于35h<sup>[12]</sup>。用<sup>14</sup>C-胺苯磺隆处理野芥*Sinapis arvensis*3d后,虽然敏感和抗性品种的离体ALS酶活性相当,但植株体内胺苯磺隆残留量却相差很大,分别是73%和17%<sup>[13]</sup>。

细胞色素P450s和谷胱甘肽转移酶(GSTs)是

生物体进行脱毒和排毒的重要酶系<sup>[14-17]</sup>。由 P450s 介导的 O-去甲基化反应是禾本科植物水稻对吡啶磺隆快速代谢失活的主要解毒形式<sup>[14]</sup>。GSTs 是一个同工酶超家族<sup>[15]</sup>, 玉米、小麦、高粱、烟草等作物对除草剂(包括磺酰脲)的耐药性均与 GSTs 有关<sup>[16]</sup>。研究发现, 经苯磺隆处理后, 敏感性弱的泽漆 *Euphorbia helioscopia* 与猪殃殃 *Galium aparine* 的 GSTs 活性明显提高并超过对照, 而敏感性强的芥菜 *Capsella bursa-pastoris*、播娘蒿 *Descurainia sophia* 的 GSTs 活性低于对照<sup>[17]</sup>。

### 3.4 ALS 基因突变

植物耐受除草剂的机理还与基因组 ALS 复制、基因突变有密切关系。目前拟南芥、油菜、玉米和许多杂草的 ALS 基因已被克隆。在拟南芥 AtALS 抗性突变中, 较显著的是 Ala122、Pro197、Ala205、Trp574、Ser653 和 Gly654 残基突变<sup>[18-21]</sup>, 这些突变改变了除草剂亲和位点的形态和结合能力<sup>[20]</sup>。野芥 *Sinapis arvensis* 中与 AtALS 的 Trp574 残基相对应位点的突变体对磺酰脲类除草剂抗性显著增强<sup>[21]</sup>。通过理化诱变和单核苷酸多态性(SNP)分子检测技术如 EcoTILLING 等可以发现更多的 ALS 基因突变<sup>[22]</sup>。

另外, ALS 基因表达水平的变化也可以影响植物对除草剂的敏感性。近年发展起来的一些植物离体(*in vitro*)和活体(*in vivo*)ALS 活性的检测方法<sup>[23-24]</sup>都可以快速有效地鉴定不同植物、不同组织对不同 ALS 抑制剂的敏感性。经苯磺隆处理后, 敏感性强的播娘蒿<sup>[17]</sup>、油菜<sup>[5]</sup>活体的 ALS 活性均低于对照; 而具有耐药性的泽漆, 虽然在开始的 1~2 d 内 ALS 活性也略有下降, 但随后其活性即升高并高于对照<sup>[17]</sup>。ALS 活性高于对照, 表明 ALS 基因表达及蛋白合成量提高, 这也很有可能增强泽漆对苯磺隆的耐药性。

## 4 ALS 抑制型除草剂的毒性机理研究

有关植物毒性(phytotoxicity)机理是 ALS 抑制型除草剂研究的薄弱环节。目前尚未确定 ALS 受抑制后, 究竟是什么原因导致植物生长停止、代谢受阻? 为此研究人员先后从不同角度提出了多种 ALS 抑制型除草剂的毒性机理假说, 可归结为支链氨基酸饥饿(缺乏)、核酸合成受阻、ALS 底物积累毒害、同化物转运受阻以及无氧呼吸毒害等。

### 4.1 支链氨基酸饥饿假说

在发现 ALS 是除草剂靶标之初, 普遍认为支链

氨基酸的含量不足是该类除草剂对植物产生毒性的原因<sup>[3]</sup>。但后来发现 ALS 受抑制后, 植物经反馈调节会大量生成游离氨基酸, 支链氨基酸含量反而升高<sup>[5, 25]</sup>。用磺氧化亚胺蛋氨酸抑制谷氨酰胺合成, 也能诱导生物体内支链氨基酸含量升高, 这是由于蛋白质转换(turnover)引起的, 即使再用氯磺隆去抑制支链氨基酸的合成也不能够阻止该效应<sup>[26]</sup>, 可见支链氨基酸匮乏并非产生植物毒性的直接原因, 而氨基酸比例失调及其导致的代谢紊乱可能更值得深入研究<sup>[5, 25]</sup>。

### 4.2 核酸合成受阻假说

Ray<sup>[27]</sup>发现氯磺隆可使蚕豆 *Vicia faba* L. 根尖细胞有丝分裂指数降低 87%。但 Rost<sup>[28]</sup>发现氯磺隆并非直接抑制 DNA 的合成, 而可能是通过抑制与细胞周期有关的 RNA 的合成而间接抑制 DNA 合成。

### 4.3 ALS 底物积累假说

ALS 受到抑制后, 其底物 2-丁酮酸(2-KB)和转氨基产物 2-氨基丁酸(2-AB)可能会积累并产生毒性<sup>[26]</sup>。但 Shaner 等<sup>[29]</sup>研究认为这些代谢中间物对植物并没有毒性。用反义基因技术抑制马铃薯 *Solanum tuberosum* 的 ALS 活性使其降低到 15%, 并未检测到 2-KB 或 2-AB 的积累<sup>[30]</sup>, 表明生物体对 2-KB 或 2-AB 的转化能力很强, 不易产生毒害。

### 4.4 同化物转运受阻假说

Bestman 等<sup>[31]</sup>发现, 用氯磺隆处理苜蓿 *Thiaspia arvense* L. 可导致同化物的转运受阻。而用咪唑乙烟酸处理豌豆 28 d 后, 碳水化合物如蔗糖、淀粉在叶片(源)中大量积累, 表明糖分转运受阻<sup>[25]</sup>。Gaston 等则认为叶片碳水化合物积累是因为根系活性受到抑制<sup>[32]</sup>。

### 4.5 无氧呼吸假说

由于尚未进行深入研究, 缺乏更多的证据支持, 上述 4 种假说均未得到完全证实, ALS 毒性机理研究似乎陷入了僵局。近年来又有人提出了无氧呼吸、过氧化假说<sup>[32-34]</sup>等观点。研究发现, 咪唑乙烟酸处理可引起豌豆根系内丙酮酸积累, 致使丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶、乳酸脱氢酶等的活性有所增强<sup>[32]</sup>, 从而使生长点组织处于无氧呼吸状态<sup>[33]</sup>, 诱导交替氧化酶(AOX, 也称抗氰氧化酶)活性增强, 表明呼吸链电子传递发生了改变<sup>[34]</sup>。也有研究发现, 转抗性 ALS 基因的烟草经过氯磺隆处理后, 其丙二醛、过氧化氢含量增长幅度小于野生型<sup>[35]</sup>。这些结果表明, ALS 抑制剂可能改变了细胞的氧化还

原电位 致使膜脂过氧化等,而这些现象与细胞凋亡特征均非常相似。但 Zabalza 等<sup>[36]</sup>进一步研究发现,细胞内另外一些过氧化状态的标志如超氧化物歧化酶(SOD)活性等并没有明显增强。由于细胞氧化还原电位对于维持细胞正常功能至关重要,如线粒体氧化还原状态与细胞周期控制有关,活性氧 Ros 在细胞凋亡中具有关键作用<sup>[37]</sup>。因此进一步研究 ALS 抑制剂是否会导致花药组织的无氧呼吸、改变氧化还原状态,可能会为解答 ALS 抑制型除草剂的毒性机理问题提供新证据。

## 5 乙酰乳酸合成酶抑制剂的杀雄活性

化学杀雄是利用植物杂种优势的一种简便方式,但目前因为对杀雄剂的作用靶标不清楚,化学杀雄剂研发具有很大偶然性,对于化学杀雄机理的研究更是落后于生产实践。在 ALS 抑制剂中,那些活性强而半衰期短的品种可作为除草剂应用,但作为化学杀雄剂则要求其半衰期尽可能长一些<sup>[5]</sup>。目前对于 ALS 抑制型除草剂对非靶标植物影响的研究主要集中于药害方面,尚未重视其化学杀雄作用<sup>[38]</sup>。笔者在筛选化学杀雄剂的过程中发现<sup>[5-8]</sup>,一些磺酰脲类化合物可以很好地抑制植物雄蕊发育,具备所谓“理想”化学杀雄剂的基本特征:完全抑制花粉形成;成本非常低廉;剂量仅为同类除草剂的 1/50 ~ 1/1 000(一般 < 1 g/hm<sup>2</sup>),符合环保要求。可以预见,针对性研制新型化学杀雄剂将开辟 ALS 研究的新方向。因为 ALS 广泛存在于各种植物当中,可以作为化学、基因工程方法诱导植物雄性不育的靶标。

笔者在博士学位论文<sup>[5]</sup>中以油菜、小麦等植物为主要研究材料,首次系统地阐述了 ALS 抑制剂作为化学杀雄剂的一些基本特征,这些结果可为研究 ALS 抑制剂的作用机理提供参考。现将主要研究结果总结如下。

### 5.1 ALS 抑制剂普遍具有杀雄作用

苯磺隆、酰嘧磺隆、咪唑乙烟酸、氯磺隆、氯嘧磺隆、吡嘧磺隆、单嘧磺隆、烟嘧磺隆、噻吩磺隆、甲磺隆等 20 多种 ALS 抑制型除草剂均可不同程度地诱导油菜等十字花科植物雄性不育;咪唑乙烟酸和另一种抑制芳香族氨基酸生物合成的除草剂草甘膦(glyphosate)也可诱导小麦产生高度雄性不育。由于磺酰脲类比其他类型除草剂对 ALS 的抑制能力更强<sup>[1]</sup>,因而从磺酰脲类敏感型植物中更容易筛选化学杀雄剂<sup>[5]</sup>。

### 5.2 杀雄剂的活性与 ALS 活性密切相关

所用杀雄剂的剂量与 ALS 活性呈现显著负相关,杀雄活性高的除草剂对 ALS 活性抑制的持续性强于杀雄效果差的除草剂。花蕾和雄蕊的 ALS 活性高于成熟叶片,但受杀雄剂处理后下降幅度更大,这可能是造成杀雄剂具有部位选择性的原因之一,这一点与除草剂的部位选择性相似<sup>[39-40]</sup>。

5.3 杀雄剂可导致支链氨基酸含量升高而不是降低  
杀雄剂、杀雄剂 + 支链氨基酸、环丙二羧酸(ALS 后续的酮醇酸还原异构酶的特异性抑制剂)处理都使得花蕾中游离氨基酸总量比对照提高,与 Royuela<sup>[25]</sup>等报道的结果一致,否定了支链氨基酸饥饿假说。

### 5.4 杀雄剂具有复杂的生理效应

杀雄剂酰嘧磺隆、苯磺隆等处理均可使油菜小孢子的不同发育阶段出现异常,如花粉母细胞核膜破裂、核仁散碎、叶绿体和质体空瘪、未形成绒毡层小体、造油体破裂或空瘪等<sup>[5]</sup>。处理油菜的丙酮酸、可溶性糖、叶绿素、类胡萝卜素、可溶性蛋白、DNA 含量以及光合速率均下降<sup>[5]</sup>。在高等植物中,ALS 蛋白由核基因编码且最终定位于质体和叶绿体上<sup>[41]</sup>。ALS 抑制型除草剂的典型特征就是可使植物叶片失绿褪色,所以剖析 ALS 抑制剂对质体、叶绿体的破坏过程有助于解释其毒性作用。

综合上述结果,可以归纳出酰嘧磺隆、苯磺隆、咪唑乙烟酸等化学杀雄剂的基本作用特征为:作用靶标是乙酰乳酸合成酶(ALS),但毒性作用体现在多个层面,包括破坏氨基酸平衡、抑制细胞分裂、干扰 DNA 合成和蛋白质代谢、破坏叶绿体和质体结构、抑制光合作用等,最终的直观效应则是抑制小孢子发育<sup>[5]</sup>。

## 6 讨论

综上所述,有关磺酰脲类、咪唑啉酮类等除草剂与靶标 ALS 的相互作用机理已逐渐趋于明朗化,但其毒性机理仍是目前研究的薄弱环节,也是今后可取得突破的方向之一。从细胞周期、细胞凋亡、质体、叶绿体等细胞器结构等角度着手进行研究,将可能会有新的重大发现。

通过对已有毒性机理方面相关实验研究的分析,笔者认为其中存在的主要问题有:1) 所用研究手段的微观深入程度不尽相同,有些方法在今天看来稍嫌粗糙;2) 有些考察指标可能是次级效应,离除草剂初级效应的差异较远;3) 研究对象有单细

胞、多细胞微生物和高等植物,这些不同层次生命体的代谢相互间存在很大差异,ALS抑制剂的毒性机制未必相同;4)有些代谢物的半衰期很短,可能还来不及检测就失活了;5)生物细胞含多种酶,代谢途径相互关联、交叉,即使能代谢毒物并显示出毒性,也不能确定究竟是哪种途径起主导作用。因此,对于高等生物,可以尝试利用分子生物学技术,把ALS基因引入到体外培养的细胞系,令其特异表达,建立一种可合成单一ALS酶的细胞株系,将有可能大幅度提高对除草剂毒性效应检测的灵敏度。

发现ALS抑制剂具有化学杀雄活性后,由此也提出一个新问题,为什么ALS抑制剂可以特异性地诱导雄性不育而对植株生长、雌蕊发育等影响很小?即仅为除草剂用量百分之几的剂量因何仍能产生杀雄活性?或者为何不抑制生长部位有丝分裂而只选择性地影响小孢子母细胞的减数分裂?已有研究发现,除草剂对组织部位的选择性与不同组织的细胞分化、代谢活跃程度<sup>[39-40]</sup>有关。化学杀雄剂亦然,植物在长期进化过程中形成的对两性生殖器官的保护程度不同,雌蕊、雄蕊的发育对物质能量需求不同,雄性发育对外界环境变化更为敏感<sup>[5]</sup>。所以苯磺隆、酰嘧磺隆、咪唑乙烟酸等在以除草剂用量的1%剂量使用时,对油菜的抑制作用仅局限于最敏感的花药组织<sup>[5]</sup>。利用ALS抑制型除草剂诱导的雄性不育明显有别于对根系或植株生长的抑制,为定性观察提供了比较直观的指标。可据此设计新的研究方法,例如比较ALS抑制剂对细胞有丝分裂、减数分裂及细胞周期的效应,对不同代谢水平、营养和能量供应水平的细胞组织的抑制效应等,从细胞学微观比较中可能会发现毒性作用的新特征。

由于ALS的次级效应及旁侧途径涉及到复杂的生理生化代谢过程,因而很有必要借助高通量的芯片杂交技术、色谱-质谱联合分析等转录组学、代谢组学技术手段寻找新的证据。例如,通过拟南芥芯片杂交,Manabe等<sup>[42]</sup>发现野生型拟南芥转录组中,首先响应咪唑乙烟酸处理的是与解毒作用相关的基因,这些基因通常参与非生物胁迫反应,包括类固醇磺基转移酶(steroid sulfotransferase)、ACC氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase)、糖基转移酶(glycosyltransferase)、谷胱甘肽硫基转移酶(glutathione transferase)、细胞色素P450、ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)、多药和毒物排出MATE(multidrug and toxin extrusion)家族以及交替氧化酶(alternative oxidase, AOX)蛋白家

族,然后才是氨基酸代谢酶、次级代谢和tRNA的变化。Das等<sup>[43]</sup>分析除草剂处理后拟南芥和甘蓝型油菜的转录组,发现受草甘膦处理后表达发生变化的基因数量比较少,而受到磺酰脲类、咪唑啉酮类除草剂处理后的转录组变化则非常复杂,除了除草剂的直接作用靶标ALS基因表达变化外,还有核糖体、蛋白翻译、次级代谢、细胞壁修饰、生长等多种相关的基因表达变化。这些新证据表明:ALS抑制剂的毒性机理很可能不是单一的支链氨基酸合成途径,而是参与ALS抑制剂响应的多种代谢途径改变后的复杂的综合效应,因此更需要运用代谢组学等方法,全面、深入地剖析组织细胞内代谢中间物的差异,避免零散分析单个代谢途径所带来的误差。

## 参考文献:

- [1] DUGGLEBY R G, MCCOURT J A, GUDDAT L W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase [J]. *Plant Physiol Biochem* 2008, 46: 309 - 324.
- [2] BINDER S, KNILL T, SCHUSTER J. Branched-chain amino acid metabolism in higher plants [J]. *Physiologia Plantarum* 2007, 129(1): 68 - 78.
- [3] ZHOU Q, LIU W, ZHANG Y, et al. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides [J]. *Pest Biochem Physiol* 2007, 89: 89 - 96.
- [4] 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: 569 - 573.
- [5] YU Cheng-yu (于澄宇). Characterization and mechanism of action of novel chemical hybridizing agents for plants(植物化学杂交剂的作用特征与机理) [D]. Yangling(杨凌): Northwest A & F University(西北农林科技大学) 2009.
- [6] YU C, HU S, HE P, et al. Inducing male sterility in *Brassica napus* L. by a sulphonylurea herbicide, tribenuron-methyl [J]. *Plant Breed* 2006, 125: 61 - 64.
- [7] YU C Y, DONG J G, HU S W, et al. Efficiency of a novel gametocide amidosulfuron on rapeseed (*Brassica napus*) [J]. *Plant Breed* 2009, 128: 538 - 540.
- [8] YU Cheng-yu(于澄宇), HU Sheng-wu(胡胜武), HE Pei-ru(何蓓如), et al. 化学杂交剂 EXP 对油菜的杀雄效果 [J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报) 2005, 31(11): 1455 - 1459.
- [9] CHEN C N, CHEN Q, LIU Y C, et al. Syntheses and herbicidal activity of new triazolopyrimidine-2-sulfonamides as acetohydroxyacid synthase inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(14): 4897 - 4904.
- [10] ROY K, PAUL S. Docking and 3D-QSAR studies of acetohydroxy acid synthase inhibitor sulfonylurea derivatives [J]. *J Mol Model* 2010, 16: 951 - 964.
- [11] PLAZA G A, OSUNA M D, PRADO R D, et al. Absorption and translocation of imazethapyr as a mechanism responsible for resistance of *Euphorbia heterophylla* L. biotypes to acetolactate synthase (ALS) inhibitors [J]. *Agron Colomb* 2006, 24(2): 302 - 305.

- [12] WITTENBACH V A , KOEPE M K. Basis of selectivity of triflurosulfuron methyl in sugar beets [J]. *Pestic Biochem Physiol* , 1994 ,49: 72 – 81.
- [13] VELDHUIS L J , HALL L M , O'DONOVAN J T , et al. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl [J]. *J Agric Food Chem* , 2000 ,48: 2986 – 2990.
- [14] DENG F , HATZIOS K K. Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice [J]. *Pestic Biochem Physiol* 2003 ,74: 102 – 115.
- [15] DIXON D P , HAWKINS T , HUSSEY P J , et al. Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily [J]. *J Exp Bot* , 2009 ,60(4) : 1207 – 1218.
- [16] GUO Yu-han( 郭玉莲) , TAO Bo( 陶波) , ZHENG Tie-jun( 郑铁军) et al. 植物谷胱甘肽 S-转移酶( GSTs) 及除草剂解毒剂的诱导作用 [J]. *J Northeast Agric Univ( 东北农业大学学报)* , 2008 ,39(7) : 136 – 139.
- [17] SUI Biao-feng( 隋标峰) , WANG Jin-xin( 王金信) , PENG Xue-gang( 彭学岗) et al. 麦田不同杂草对苯磺隆敏感性差异的分子机制 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica( 植物保护学报)* , 2007 , 34(2) : 204 – 207.
- [18] SHIVRAINA V K , BURGOSA N R , SALES M A , et al. Polymorphisms in the *ALS* gene of weedy rice (*Oryza sativa* L.) accessions with differential tolerance to imazethapyr [J]. *Crop Protect* 2010 ,29(4) : 336 – 341.
- [19] VILA-AIUB M M , NEVE P , POWLES S B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants [J]. *New Phytolog* 2009 ,184: 751 – 767.
- [20] YU Z , WEN X , XI Z. Insight into herbicide resistance of W574L mutant *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: molecular dynamics simulations and binding free energy calculations [J]. *Sci China Chem* 2010 ,53: 91 – 102.
- [21] MICHAEL J C , VIJAY K N , KIRK A H , et al. Target-site resistance to acetolactate synthase in wild mustard (*Sinapis arvensis*) [J]. *Weed Sci* 2006 ,54(2) : 191 – 197.
- [22] 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(2) : 143 – 148.
- [23] KUK Y I , JUNG H I , KWON O D , et al. Rapid diagnosis of resistance to sulfonylurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*) [J]. *Weed Sci* 2003 ,51(3) : 305 – 311.
- [24] LIU F , ZHANG F , JIN Z , et al. Determination of acetolactate synthase activity and protein content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves using visible/near-infrared spectroscopy [J]. *Analytica Chimica Acta* 2008 ,23(1-2) : 56 – 65.
- [25] ROYUELA M , GONZÁLEZ A , GONZÁLEZ E M , et al. Physiological consequences of continuous ,sublethal imazethapyr supply to pea plants [J]. *J Plant Physiol* 2000 ,157: 345 – 354.
- [26] RHODES D , HOGAN A L , DEAL L , et al. Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. II. Responses to chlorsulfuron [J]. *Plant Physiol* ,1987 ,84: 775 – 780.
- [27] RAY T B. The mode of action of chlorsulfuron: a new herbicide for cereals [J]. *Pestic Biochem Physiol* ,1982 ,17: 10 – 17.
- [28] ROST T L , GLADISH D , STEFFEN J , et al. Is there a relationship between branched amino acid pool size and cell cycle inhibition in roots treated with imidazolinone herbicides? [J]. *J Plant Growth Regul* ,1990 ,9: 227 – 232.
- [29] SHANER D L , SINGH B K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-amino butyrate [J]. *Plant Physiol* ,1993 ,103: 1221 – 1226.
- [30] HÖFGEN R , LABER B , SCHÜTTKE I , et al. Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition: molecular and biochemical analysis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) plants [J]. *Plant Physiol* , 1995 ,107: 469 – 477.
- [31] BESTMAN H D , DEVINE M D , BORN W H V. Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thiaspi arvense* L.) seedlings [J]. *Plant Physiol* ,1990 ,93: 1441 – 1448.
- [32] GASTON S , ZABALZA A , GONZÁLEZ E M , et al. Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants [J]. *Physiologia Plantarum* 2002 ,114(4) : 524 – 532.
- [33] ZABALZA A , GONZÁLEZ E M , ARRESE-IGOR C , et al. Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants [J]. *J Agric Food Chem* 2005 ,53: 7486 – 7493.
- [34] GASTON S , RIBAS-CARBO M , BUSQUETS S et al. Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean [J]. *Plant Physiol* 2003 ,133: 1351 – 1359.
- [35] KAPCHINA-TOTEVA V , SLAVOV S , BATCHVAROVA R , et al. Stress markers in chlorsulfuron tolerant transgenic tobacco plants [J]. *Bulg J Plant Physiol* 2004 ,30(1-2) : 103 – 111.
- [36] ZABALZA A , GASTON S , SANDALIO L M , et al. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase [J]. *Environ Exp Bot* 2006 ,59(2) : 150 – 159.
- [37] ROTHSTEIN E C , LUCCHESI P A. Redox control of the cell cycle: a radical encounter [J]. *Antioxid Redox Signal* ,2005 , 7(5-6) : 701 – 703.
- [38] VANCETOVIC J , VIDAKOVIC M , STEFANOVIC L , et al. Imazethapyr resistance found in the material of the MRI Zemun Polje gene bank [J]. *Maydica* 2007 ,52: 235 – 238.
- [39] DEGRANDE D , DEWAELE E , RAMBOUR S. The *AHAS* gene of *Cichorium intybus* is expressed in fast growing and inflorescential organs [J]. *Physiologia Plantarum* 2000 ,110(2) : 224 – 231
- [40] SHIM S I , LEE B M , RYU E I , et al. Response of leaf acetolactate synthase from different leaf positions and seedling ages to sulfonylurea herbicide [J]. *Pestic Biochem Physiol* 2003 , 75: 39 – 46.
- [41] SHIMIZU M , GOTO M , HANAI M et al. Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco [J]. *Plant Physiol* ,2008 , 147(4) : 1976 – 1983.
- [42] MANABE Y , TINKER N , COLVILLE A , et al. CSR1 , the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol* 2007 ,48(9) : 1340 – 1358.
- [43] DAS M , REICHMAN J R , HABERER G , et al. A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Bio* 2009 ,72: 545 – 556.

(责任编辑: 唐 静)