

ALS 抑制剂类除草剂的抗性研究概述

辛洁, 徐小博, 王磊, 朱晔荣*, 王勇* (南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 乙酰乳酸合成酶(ALS)是支链氨基酸生物合成途径中的关键酶之一,是磺酰脲类除草剂的作用靶标。针对目前市场上使用的4种ALS除草剂,对ALS抑制剂类除草剂的抗性杂草问题,ALS氨基酸序列中关键位点替换对ALS酶活性的影响与ALS基因编辑等方面的相关研究进展进行了概述。

关键词 乙酰乳酸合成酶;除草剂;抗性杂草;基因编辑

中图分类号 S482.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)04-0018-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.04.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Resistance of ALS Inhibitor Herbicides

XIN Jie, XU Xiao-bo, WANG Lei et al (College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Acetolactate synthase (ALS) is a key enzyme in the branched chain amino acid biosynthesis pathway, and it is an important target for sulfonylurea herbicides. This article is a brief overview of study about ALS inhibitor herbicides and resistance weeds problem, including ALS inhibitor herbicides used in commercial, the problem of resistance weeds to ALS herbicides, the effect of ALS enzyme activity resulting from the ALS amino acids substitution, and ALS gene editing.

Key words Acetylactate synthase; Herbicides; Resistance weeds; Gene editing

乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS, EC 2.2.1.6)是催化支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)生物合成途径中的关键酶之一。ALS酶只存在于植物和微生物体内,如果采用ALS抑制剂对植物,包括农作物进行处理,不会影响食草动物和人类体内支链氨基酸的生物合成,因此ALS抑制剂的使用对动物而言具有生物安全性^[1]。酶活性的发挥与酶蛋白的结构密切相关,对于ALS而言,其结构的解析是深入研究和利用ALS的基础。关于乙酰乳酸合成酶ALS的结构研究,首先是在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行的,并且到目前为止,大肠杆菌ALS酶的结构也是研究最为清楚的。研究发现大肠杆菌的ALS酶为四聚体,由2个大亚基和2个小亚基组成,大亚基的分子量约为60 kD,小亚基的分子量为10~20 kD^[2-6]。自从ALS酶的结构开始解析以来,针对ALS酶为靶标的除草剂的研发也如火如荼展开着。农药工作者先后开发出了不同系列的抑制剂,并成功推广为商业化使用的除草剂。随着除草剂的大量使用,特别是同一种除草剂的连续使用,杂草对某些抑制剂产生了抗性。为消除杂草,一些除草剂被加大剂量使用,尤其是残留期较长的除草剂的使用,对土壤质地和农作物的正常生长造成严重危害,近年来关于ALS除草剂的结构、除草活性与抗性杂草问题的研究逐步深入,并取得了可喜的进展。笔者概括了近年使用的几种主要ALS除草剂及其抗药性问题,同时围绕ALS酶编码基因介绍了基因编辑等方面的主要研究进展。

1 ALS抑制剂类除草剂的作用和应用

1.1 作用 ALS抑制剂类除草剂不仅对动物具有生物安全

性,而且该类除草剂的使用量显著低于其他除草剂,具有广谱除草、选择性强、低毒高效、土壤残留活性低的优点^[7]。现已开发出的ALS抑制剂类除草剂共有13类50余种,包括磺酰脲类(sulfonylureas, SU)^[8-9]、嘧啶氧苯甲酸类(pyrimidinyl-oxy benzoic acids, PTB, 又称嘧啶水杨酸类)^[10-11]、咪唑啉酮类(imidazolinones, IMI)^[12]和三唑并嘧啶磺酰胺类(triazolopyrimidine sulfonanilides, SUT)^[13]等主要类型^[14]。它们的作用机制相同,都是通过抑制乙酰乳酸合成酶的活性,从而影响支链氨基酸和蛋白质的合成,导致植物生长停止而死亡。植物吸收上述4类除草剂的方式也相同,都通过茎叶和根吸收后在木质部与韧皮部传导进行传输,最后积累于分生组织,即通过内吸传导作用进行。

1.2 应用 虽然这4类除草剂的作用和吸收方式相同,但是它们的结构(图1)^[15]、作用杂草的种类、使用剂量、残留期等有所不同(表1),因此,针对不同的作物需要有选择地使用不同类型的ALS除草剂。

2 ALS抑制剂类除草剂的抗性杂草问题

生产实践中ALS类除草剂的使用推广极大地提高了农业生产的产量,减少了人力除草的成本,显著增加了农民的经济收入。但过度依赖单一除草剂(或作用位点相同的除草剂)可能导致对这种或这类除草剂有抗性的杂草种群出现^[16]。特别是ALS抑制剂类除草剂,一直因其作用靶标单一且易诱发杂草抗性而面临着众多问题。不同种类的ALS除草剂的应用作物之间有一定的特异性,使得某些作物中的杂草只能长期使用同种除草剂,这样便导致ALS除草剂抗性杂草的快速发生。

1998年ALS抑制剂类除草剂在已被报道的抗性杂草数量方面超过了所有其他类除草剂(图2)^[17]。近年,ALS抑制剂类除草剂面临的杂草抗性问题的呈现进一步恶化的趋势。由表2可知(通过总结统计Weed Science网站http://www.weedscience.org/数据做图),仅2016、2017年2年时间,便已

基金项目 国家重点研发计划子课题(2017YFD01005050103);天津市2018年现代农业产业技术体系创新团队建设项目(ITRRS2018003)。

作者简介 辛洁(1993—),女,山东青州人,硕士研究生,研究方向:植物生理与分子生物学。*通信作者:朱晔荣,副教授,从事植物分子生物学与生物技术研究;王勇,教授,从事植物分子生物学与生物技术研究。

收稿日期 2018-08-26;修回日期 2018-09-27

发现有 22 例 ALS 抗性杂草情况的发生。因此亟需对 ALS 抑制剂类除草剂的抗性问题的研究展开深入研究。

3 ALS 基因中突变位点的研究

Lawther 等^[18]首先在大肠杆菌中发现并克隆到了 ALS 基因。Falco 等^[19]在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中也发现并克隆到了 ALS 基因。截至目前,借助于拟南芥和烟草的基

因组文库信息,相继筛选到了多种植物的 ALS 基因^[20-21]。其中拟南芥 ALS 基因的发现和克隆有着重要的意义,其为人们发掘植物,特别是农作物的 ALS 基因提供了重要的信息。Wiersma 等^[22]发现芸苔属的多个种具有 ALS 基因,且发现该物种存在 4 个以上的 ALS 基因。李汝刚等^[23]研究也发现 ALS 基因在芸苔属亚种间和品种间存在广泛的遗传变异性。

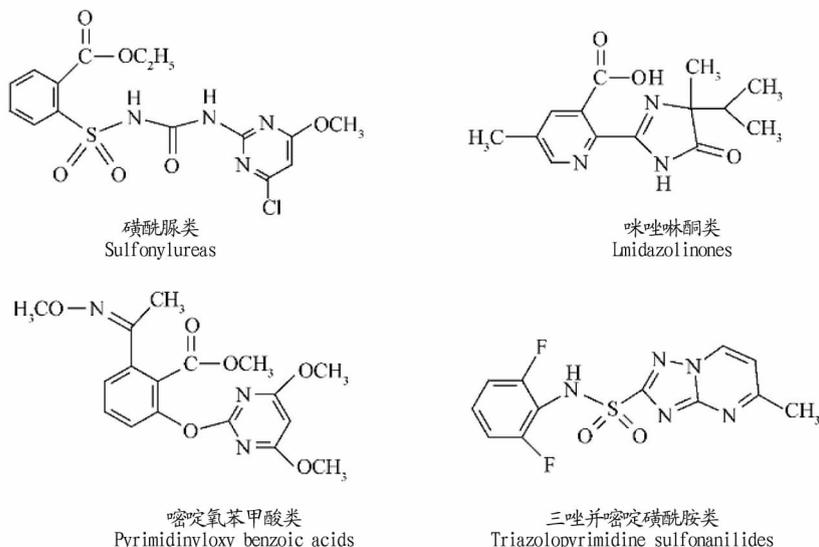


图 1 典型的商品化 ALS 抑制剂类型

Fig.1 Typical types of commercial ALS inhibitors

表 1 4 类除草剂特点

Table 1 Characteristics of four kinds of herbicide

除草剂 Herbicides	结构特点 Structure characteristics	有效成分用量 Dosage of active ingredient//g/hm ²	应用 Application	残效期 Residual life	后茬作物伤害 Damage to aftercrop
磺酰脲类 Sulfonylureas	磺酰脲桥结构是具备较高活性的决定因素	4~70	1 年生或多年生阔叶杂草及部分禾本科	氯磺隆、甲磺隆、胺苯磺隆、氯嘧磺隆、单嘧磺隆残效期长	可化学水解、微生物降解、光解或挥发无伤害(除残效期长品种外)
咪唑啉酮类 Imidazolinones	母体结构由磺酰脲类活性亚结构拼接衍生	40~100	1 年生或多年生阔叶杂草及部分禾本科	长	不易挥发和光解,残留长达半年,有伤害
三唑并嘧啶磺酰胺类 Triazolopyrimidine sulfonanilides	以磺酰脲类为先导通过分子重排与结构修饰得到	3~60	阔叶杂草及禾本科杂草效果更好	长	作为弱酸性分子,其残留期是典型的 pH 依赖型,有伤害
嘧啶氧苯甲酸类 Pyrimidinyloxy benzoic acid	磺酰脲类除草剂结构改造得到	15~50	主要防除阔叶杂草,兼治禾本科杂草及莎草科	短	无伤害

不同课题组通过比对不同物种之间克隆的 ALS 基因序列,发现 ALS 基因中存在 8 个保守氨基酸^[24],进一步研究发现这 8 个氨基酸的改变是导致 ALS 抑制剂类除草剂抗性杂草产生的主要原因,这 8 个位点分别是第 122 和 205 位的 Ala,第 19、376、377、574、653 和 654 位的 Pro、Asp、Arg、Trp、Ser 和 Gly(图 3,通过总结统计 Weed Science 网站 <http://www.weedscience.org/> 数据做图)^[25]。图中信息表明有些氨基酸位点在不同植物中发生取代的频率很高,如第 574、197、653 等位点,而且个别氨基酸可以突变为不同种类的氨基酸,如 197 位 Pro 氨基酸可能会突变为 Thr、Leu、Ala、His、Asn 等 11 种氨基酸,使得杂草对原有除草剂产生抗性。

4 ALS 基因编辑研究

由上所述可知,抗性杂草 ALS 基因位点的突变是引起抗性的分子基础,意味着通过 ALS 基因的优化有望解决抗性杂草问题。近年来不同研究组证实 ALS 酶中氨基酸序列的替换是解决 ALS 抑制剂类除草剂抗性杂草多发问题的策略。如许多课题组针对 ALS 氨基酸替换展开研究,包括单点突变和多点同时突变等,以期解决抗性杂草带来的作物减产等严重问题。有的通过利用杂草产生的自然突变位点来培育抗性作物,更多的是采用基因编辑技术对 ALS 基因进行点突变以获得抗性作物。

综合近年对 ALS 氨基酸序列进行点突变的研究报道发

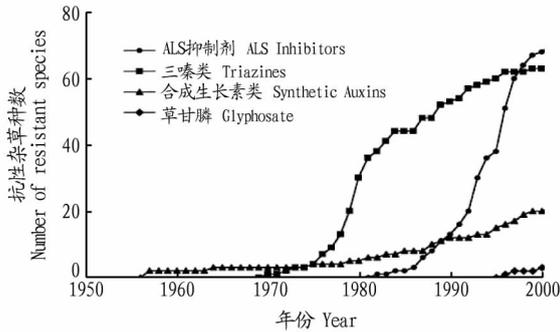
图2 全球抗性杂草种类^[17]Fig.2 The number of herbicide-resistant weeds for several herbicide classes^[17]

表2 2016—2017年报道的ALS抗性杂草事件

Table 2 The events of ALS resistant weeds reported in 2016 and 2017

年份 Year	地区 Area	杂草种类 Weed species
2016	美国内布拉斯加州	长芒苋
2016	巴西	鬼针草
2016	法国	野苘蒿
2016	法国	虞美人
2016	美国新泽西州	豚草
2016	美国马克兰州	豚草
2016	美国密歇根州	豚草
2016	美国加利福尼亚州	黑麦草
2016	巴西	黑麦草
2016	阿根廷	短莪芥末
2016	巴西	长芒苋
2016	美国伊利诺斯州	长芒苋
2016	丹麦	黑麦草
2016	美国蒙大拿州	绢雀麦
2016	拉脱维亚	鹅肠草
2016	丹麦	阿披拉草
2017	澳大利亚新南威尔士州	早熟禾
2017	巴西	黑麦草
2017	中国	反枝苋
2017	巴西	野苘蒿
2017	乌克兰	稗属
2017	匈牙利	假高粱

现,大多研究是针对ALS氨基酸序列中高发生突变位点进行编辑。研究最多是针对杂草中197位的Pro突变,作物中Pro位点的突变能使其产生磺酰脲类除草剂抗性。如2015年,有报道显示利用Cas9的基因编辑技术对玉米的ALS基因进行了点突变处理,用Ser替换了165位的Pro,培育出了抗除草剂(氯磺隆)的基因编辑玉米。转基因株系的除草剂处理显示,无论是对4周龄的幼苗进行氯磺隆喷洒,还是在培养玉米种子的培养基中直接添加氯磺隆,未做编辑的野生型已经出现叶片黄化、植株矮小萎蔫的生长状况,而经编辑的株系生长正常^[26]。2017年,Chen等^[27]在拟南芥中,利用传统Cas9系统结合胞苷脱氨酶BE3使197位Pro的C碱基变为T碱基,结果发现在使用5 mg/L苯磺隆处理的情况下,野生型完全无法生长而突变株生长状况与无处理的对照组差异很小。2018年,北京市农林科学院国家蔬菜工程技术中心许勇研究团队与中国农业大学姜临建课题组合作利用CRISPR/Cas9单碱基编辑技术在西瓜内源ALS基因上引入了单碱基突变,使190位的Pro被Ser替换,创制出全球首个基因编辑抗除草剂(苯磺隆)的西瓜^[28]。

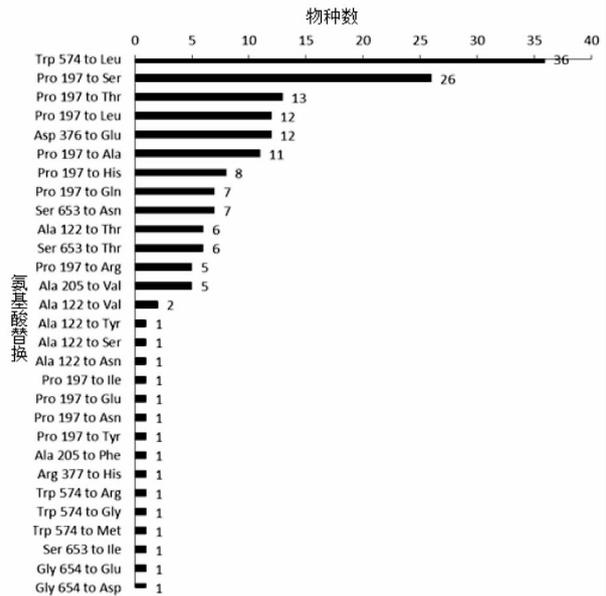


图3 ALS除草剂产生抗性的氨基酸替换位点

Fig.3 Amino acid replacement sites for the resistance of ALS herbicides

另外,也有针对其他热点的单突变,如杂草中122位的Ala突变能使作物产生磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂抗性。2018年Zenpei Shimatani课题组将水稻中96位(杂草中为122位)Ala替换为Val,并在0.07 mg/L甲氧草烟烟处理条件下相对野生型就已表现出明显的生长优势^[29]。

除上述单位点突变,还有双位点突变成功的报道。如杂草中574位的Trp突变能使作物产生对磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂的抗性,杂草中653位的Ser突变能使作物产生对咪唑啉酮类除草剂的抗性,而多位点突变可能会产生交互抗性或新的除草剂抗性。2016年报道以Cas9技术对水稻ALS基因进行突变处理,分别将548位(杂草中为574位)Trp和627位(杂草中为653位)Ser替换为Ler和Ile,培育出了抗双草醚的基因编辑水稻。使用双草醚喷洒处理五叶期基因编辑水稻和野生型水稻,结果显示野生型叶片黄化、植株矮小萎蔫十分严重,而经编辑的株系生长正常^[30]。

5 展望

综上所述,尽管使用ALS除草剂是非常有效的杂草清理方法,但是由于不同种类ALS除草剂对不同作物的作用效果有较大差异,大部分作物只能依赖特定或某几种除草剂来清除杂草,这种长期过度依赖单一或一类除草剂导致抗性杂草种群的出现。针对ALS抗性杂草严重影响作物生长及产量的问题已经引起农业产业领域相关学科的极大关注,而且在未来几年,仍将是研究热点。一方面亟需设计合成,或通过对已有除草剂的修饰来开发绿色环保的新型ALS除草剂;另一方面,ALS基因的编辑有望成为解决ALS抗性杂草问题的重要途径之一。笔者所在的课题组近年也在采用基因编辑技术,对ALS基因进行点突变。以模式植物拟南芥为材料,进行改造后ALS基因的遗传转化,以探究ALS基因中特定编码氨基酸的替换是否能使拟南芥获得目的除草剂抗性,目前

已经获得数个具有特定除草剂抗性的转基因拟南芥株系。

参考文献

- [1] 朱振兴,李丹,王春雨.利用玉米乙酰乳酸合成酶基因 ALS 点突变处理培育抗除草剂高粱[J].分子植物育种,2017,15(11):4563-4572.
- [2] EOYANG L, SLIVERMAN P M.Purification and submit composition of acetohydroxyacid synthase[from Eshierchia coli K-12[J].Journal of Bacteriology,1984(157):184-189.
- [3] LAWTHOR R P, CALHOUN D H.Molecular basis of valine resistance in Eshierchia coli K-12[J].Proceeding of Natural Academic Science USA, 1982(78):922-925.
- [4] SCHLOSS J, VAN DYK D, VASTA J, et al.Purification and properties of salmonella typhmuriumacetolactate synthase isozyme II from Eshierchia coli HB101/pUD9[J].Biochemistry,1985(24):4952-4959.
- [5] SQUIRES C H, DEFELICE M.Molecular structure of ilvH and its evolutionary relationship to ilvG in Eshierchia coli K-12[J].NucleicAcids Research,1983(11):5299-5313.
- [6] SHANER D L, ANDERSON P C, STIDHAM M A.Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase[J].Plant Physiol,1984,76(2):545-546.
- [7] 曲仁渝,刘玉超,陈琼,等.具有除草活性的 AHAS 抑制剂小分子的研究进展[J].华中师范大学学报,2015,49(5).
- [8] 王茜,张婉如,王晓萍.磺酰胺类除草剂的降解性及其应用[J].黑龙江农业科学,2017,1:146-149.
- [9] 张涛,董喜成,陈海峰,等.Sulfonylurea 类 ALS/AHAS 抑制剂作用方式的分子对接研究和新抑制剂的虚拟筛选[J].化学学报,2006,64(9):899-905.
- [10] 张特,赵强,康正华,等.噻啉(氧) 硫苯甲酸类除草剂研究进展[J].植物保护,2018,44(2):22-28.
- [11] 刘长令.噻啉氧(硫) 苯甲酸类除草剂的创制经纬[J].农药,2002,9.
- [12] 张恒敏.咪唑啉酮类除草剂的结构-活性关系及合成进展[J].农药,1991,30(3).
- [13] 赵青山,付颖,叶非.三唑并噻啉磺酰胺类除草剂的研究概况[J].植物保护,2011,37(2):14-19.
- [14] 李关羽,付颖,叶非.靶标酶在除草剂研究与开发中的作用[J].农药科学与管理,2012,33(9)
- [15] 王建国.乙酰乳酸合成酶及其抑制剂研究新进展[J].农药学报,2014,16(4):367-374.
- [16] 陈世国,强胜.生物除草剂研究与开发的现状及未来的发展趋势[J].

- 中国生物防治学报,2015,31(5):770-779.
- [17] Ian Heap.Global perspective of herbicide-resistant weeds.PestManag Sci, 2014, 70:1306-1315.
- [18] LAWTHOR R P, NICHOLS B.The nucleotide sequence Preeeding and including of the ilvE gene of the ilvGEDA operon of Eshierchia coli K-12 [J].Nucleic Acids Research,1979(7):2289-2301.
- [19] FALCO S C, DUMAS K S.Genetic analysis of mutants of saccharomyces cerevisiae resistant to the herbicide sulfometuronmethyl[J].Genetics,1985(109):21-35.
- [20] MOURAD G, PANDEY B, KING J.Isolation and genetic analysis of a triazolopyrimidine- resistant mutant of Arabidopsis [J].J Hered,1993,84(2):91-96.
- [21] 任洪雷.乙酰乳酸合成酶及 ALS 基因研究概述[J].中国农学通报,32(26):37-42.
- [22] WIERSMA P A, SCHIEMANN M G, CONDIE J A, et al.Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from Brassica napus[J].Molecular general genetics,1989,219(3):413-420.
- [23] 李汝刚, MCFERSO N J R, KRESOVICH S.乙酰乳酸合成酶基因在芸苔属栽培种内的遗传变异[J].生物多样性,1998,6(1):6-12.
- [24] 陈金奕.反枝苋对咪唑乙烟酸抗性水平及分子机制[J].植物保护,2015.2.
- [25] IAN HEAP.Global perspective of herbicide-resistant weeds.PestManag Sci 2014,70:1306-1315.
- [26] SVITASHEV S, YOUNG J K, SCHWARTZ C, et al.Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using cas9 and guide RNA[J].Plant Physiol,2015,169(2):931-945.
- [27] CHEN Y Y, WANG Z P, NI H W, et al.CRISPR/Cas9-mediated base editing system efficiently generates gain-of-function mutations in Arabidopsis [J].Science China,2017,60(5):520-523.
- [28] TIAN S W, JIANG L J, CUI X X, et al.Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/ Cas9-mediated base-editing[J].Plant cell reports,2018,37(9):1353-1356.
- [29] SHIMATANI Z, FUJIKURA U, ISHII H, et al.Inheritance of coedited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice[J].Plant physiology and biochemistry,2018,131:78-83.
- [30] SUN Y W, ZHANG X, WU C Y, et al.Engineering herbicideresistant rice plants through CRISPR Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase[J].Mol Plant,2016,9(4):628-631.

(上接第 17 页)

不同,但是活化能和频率因子均随升温速率的增加而增大;无论是热解反应还是燃烧反应,随着升温速率的增加,反应所需的活化能也在增加,表明升温速率高的反应比升温速率低的反应更难进行,同时需要的条件更为苛刻,需要特别考虑;对比热解和燃烧所需的活化能,发现热解比燃烧所需的活化能低,表明热解反应比较容易进行。

(5)通过对比不同种类的秸秆燃烧与热解的特性发现:同一地区的玉米秆、稻秆和麦秆 3 种生物质的热解与燃烧规律基本一致。

生物质作为一种可再生资源,目前全世界对它的研究才刚成型,并未进行规模化的投产。在能源供应十分紧张条件下,对生物能源的研究开发更需要加快脚步,而秸秆作为生物质能源的最主要成分,更需要寻求工业化投产的道路。

参考文献

- [1] 吕学敏,虞亚辉,林鹏,等.典型生物质燃料层燃燃烧特性的试验研究[J].动力工程,2009,29(3):282-286.
- [2] 王少光,武书彬,郭秀强,等.玉米秸秆木素的化学结构及热解特性[J].华南理工大学学报(自然科学版),2006,34(3):39-42.
- [3] 张郑磊,柳丹,王晋权.不同催化剂下玉米秸秆热解产物特性研究[J].锅炉技术,2008,39(6):75-78.

- [4] 崔淑卿,陈娟,张金平.我国生物质能发电前景分析[J].内蒙古科技与经济,2008(16):96-97.
- [5] 冯立波.垃圾焚烧发电技术应用过程中的研究[J].能源环境保护,2009,23(5):12-15.
- [6] 陈军,秦永生.秸秆生物质炭化生产项目可行性分析和探讨[J].资源与发展,2006(4):36-39.
- [7] 李永玲,吴占松.秸秆热解特性及热解动力学研究[J].热力发电,2008,37(7):1-5.
- [8] VAN DEN BROEK R, FAAIJ A, VAN WIJK A. Biomass combustion for power generation[J].Biomass & bioenergy,1996,11(4):271-281.
- [9] DEMIRBAS A. Combustion characteristics of different biomass fuels[J]. Progress in energy & combustion science,2004,30(2):219-230.
- [10] 蒋剑春,沈兆邦.生物质热解动力学的研究[J].林产化学与工业,2003,23(4):1-6.
- [11] 吴今姬,宋卫东,王朋友,等.农林生物质综合利用现状[J].中国农机化学报,2013,34(6):32-35,58.
- [12] 吴亭亭,曹建勤,魏敦崧,等.等温热重法生物质空气气化反应动力学研究[J].煤气与热力,1999,19(2):3-5,9.
- [13] 周新华,齐杰杰,郝宇,等.玉米秸秆热解规律的试验研究[J].可再生能源,2005(6):21-23.
- [14] 宋春财,胡浩权,朱盛维,等.生物质秸秆热重分析及几种动力学模型结果比较[J].燃料化学学报,2003,31(4):311-316.
- [15] 田松峰,薛海亮,付小倩,等.玉米秸秆燃烧特性的实验分析[J].电站系统工程,2008,24(1):21-23.
- [16] 臧丹丹,陈良勇,任强强.生物质热解与燃烧特性试验研究[J].锅炉技术,2008,39(3):77-80.
- [17] 任强强,赵长遂.升温速率对生物质热解的影响[J].燃料化学学报,2008,36(2):232-235.