

UDK 616:632.5:632.954

Pregledni naučni rad

**GENETIČKO-BIOHEMIJSKE OSNOVE REZISTENTNOSTI
KOROVSKIH BILJAKA PREMA HERBICIDIMA INHIBITORIMA
ACETOLAKTAT SINTETAZE (ALS)**

Vaskrsija JANJIĆ^{1,2}, Ljiljana RADIVOJEVIĆ¹,
Siniša MITRIĆ² i Goran MALIDŽA³

¹Institut SRBIJA - Centar za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun

²Poljoprivredni fakultet, Banja Luka

³Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Janjić Vaskrsija, Ljiljana Radivojević, Siniša Mitrić and Goran Malidža (2004): *Genetic and biochemical basis of weed resistance to ALS-inhibiting herbicides (ALS)*. - Acta herbologica, Vol. 13, No. 2, 319-332, Beograd.

Genetic and biochemical bases of resistance of weed plants to herbicides that inhibit acetolactate synthetase (ALS) are reviewed. Resistance to sulfonyl urea and imidazolinone herbicides and their new derivative products, namely triazolopyrimidin sulfoanilide, pyrimidinil oxybenzoi acid, non-aromatic imidazolinone and sulphonyl carboxiamide is discussed. The main biosynthetic pathway of amino acids with branching chains (valine, isoleucine and leucine) is shown, as well as the herbicides' mechanisms of inhibition of ALS enzyme.

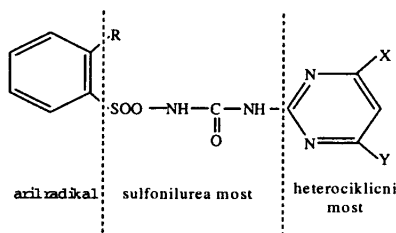
Key words: resistance, ALS inhibitors, sulfonylurea, imidazolinone, acetolactate synthetase (ALS)

UVOD

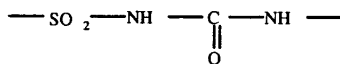
Još pre 20 godina je utvrđeno da je enzim acetolaktat sintetaza (ALS) primarno mesto delovanja jedne nove klase herbicida sulfonilurea i imidazolinona (RAY, 1984). U proteklim godinama obavljena su mnoga istraživanja koja su doprinela razumevanju ovog enzima kao ciljanog mesta delovanja herbicida. Derivatizacijom imidazolinona i sulfonilurea dobijeni su novi herbicidi iz ovih klasa. Svi ovi herbicidi neobično interreaguju sa enzimom, a ove interakcije mogu biti od koristi za objašnjenje njihove efikasnosti. Neočekivano brzo pojavila se rezistentnost nekih korovskih biljaka (*Lactuca serriola* L., *Kochia scoparia* (L.) Schrad.) na ove herbicide (MOLLORY-SMITH *i sar.*, PRIMIANI *i sar.*, 1990a). Od pojave prvih korovskih biljaka koje su razvile rezistentnost na ALS inhibitore do danas stalno je rastao broj novih vrsta rezistentnih na ove herbicide. I danas taj broj prevazilazi broj korovskih biljaka koje su razvile rezistentnost na stare, dugo i stalno upotrebljavane triazinske herbicide. Prema podacima HEAP (1999) u čitavom svetu postoji 58 vrsta rezistentnih na ALS inhibitore. Sa razvojem ove pojave razvijale su se i različite procedure radi još boljeg razumevanja mehanizma rezistentnosti i praćenja promena osetljivosti enzima na delovanje herbicida. (GERWICK *i sar.*, 1993). Poseban napredak je učinjen razvojem metoda prečišćavanja ALS iz kukuruza, kao i otkriće postojanja enzima u monomernom i oligomernom stanju agregacije. Interakcija enzima sa herbicidom zavisi i od stanja agregacije enzima.

HEMIJSKA STRUKTURA I BIOLOŠKA AKTIVNOST ALS INHIBITORA

Hemijska struktura ove klase herbicida može se predstaviti na sledeći način:



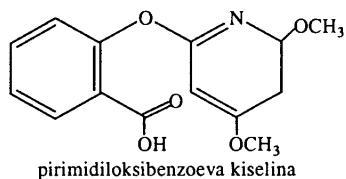
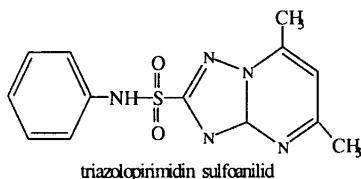
Molekul herbicida sulfonilurea sastoji se od aril radikala, heterocikličnog prstena i sulfonilurea mosta. Najčešće, kod danas poznatih herbicida, aril radikal čine prsten fenil, naftil, tiofen, furan i piridin (LEVITT, 1984), a heterociklični prsten, prsten simetričnog pirimidina, simetričnog triazina i triazola. Klasični sulfonilurea most ima sledeću strukturu:



Ovaj most može biti modifikovan, ali se ovim modifikacijama herbicidna aktivnost umanjuje (SAUERS, 1983). Herbicidna aktivnost ne zavisi samo od prirode sulfonilurea grupe nego i od položaja ove grupe u odnosu na druge

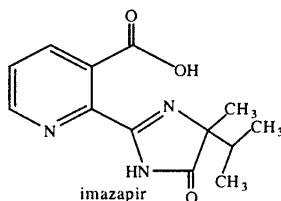
supstituente u aril radikalu. Takođe, nivo aktivnosti svakog modifikovanog sulfonilurea mosta zavisi od tipa aril i heterocikličnog prstena u molekulu. Kada je u pitanju fenil grupa, najjaču heterocikličnu aktivnost imaju jedinjenja kod kojih je supstituent u orto položaju u odnosu na sulfonilurea most. Visoku herbicidnu aktivnost imaju jedinjenja kod kojih je heterociklični prsten pirimidina ili triazina koji sadrži alkil ili aloksi supstituent u položaju X i Y. Ostali heterociklusi sa azotom kao što su triazoli, asimetrični triazini, pridini i supstituisani pirimidini, imaju uvek nižu herbicidnu aktivnost (LEVITT, 1982; SELBY I WOLF 1983; TOPFL I KRISTINSSON 1983; ZIMMERMAN, 1984).

Iz klase sulfonilurea proizašle su dve nove klase herbicida. Reorganizacijom sulfonilurea mosta nastale su nove klase: triazopirimidin sulfonilurea i pirimidil oksibenzoeva kiselina (GERWICK *i sar.*, 1990; HAWKES, 1989; SUBRAMANIAN *i sar.*, 1989).

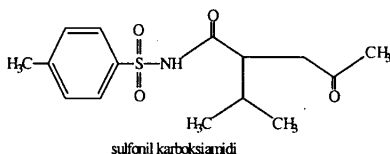


Triazopirimidin sulfonilid razlikuje se od klase sulfonilurea po tome što umesto piridinovog prstena imaju triazopirimidin prsten i što benzolov prsten ima dva supstituenta u orto položaju. Pirimidil oksibenzoeva kiselina je značajno promenjen molekul u odnosu na sulfoniluree. Od opšte strukture sulfonilurea on ima samo meta supstituisan pirimidin prsten.

Imidazolinoni su karakteristični po tome što je imidazolinon prsten vezan za aromatični prsten u položaju 2. Aromatični prsten sadrži karboksilnu kiselinsku grupu u orto položaju prema imidazolinonovom prstenu. Imidazolinoni koji sadrže tri različita aromatična prstena su komercijalizovani.



Dve nove klase herbicida proizašle su iz imidazolinona: nearomatični imidazolinoni i sulfonilkarboksamidi.



Nearomatični imidazolinoni od imidazolinona se razlikuju po tome što u aromatičnom prstenu sadrže izmenu kod 2-buten kiselinu (PATENT J63196-570A). Sulfonil karboksimidi su takođe derivati imidazolinona (ALVARADO *i sar.*, 1989).

BIOSINTEZA AMINOKISELINA SA RAZGRANATIM LANCEM

Valin, izoleucin i leucin se sintetizuju u biljkama i mikroorganizmima uobičajenim putem. U ovaj proces su uključena četiri enzima: acetolaktat sintetaza, kiselna keto reduktoizomeraza, kiselna dihidroksi dehidrataza i razgranata aminokiselinska transaminaza. U biosintezi izoleucina učestvuje još jedan dodatni enzim treonin dehidrataza, a u biosintezi leucina učestvuju još tri dodatna enzima 2-izoropilmalat sintetaza, 3-izopropilmalat dehidrataza i 3-izopropilmalat dehidrogenaza (JONES *i sar.*, 1985; MIFLIN, 1974).

Regulacija puteva biosinteze u biljkama dešava se inhibicijom treonin dehidrataze kod izoleucina (SHARMA I MAZUNDER, 1970) inhibicijom 2-izopropilmalat sintetaze kod leucina (OAKS, 1965) i inhibicijom ALS kod sve tri aminokiseline (MIFLIN, 1971; MIFLIN I CAVE, 1972).

U procesu sinteze valina, izoleucina i leucina učestvuju četiri enzima (BAYER, 1980). Enzim acetolaktat sintetaza (ALS) katalizuje prvu reakciju u biosintezi ovih aminokiselina iz piruvata. Za svoju aktivnost ovaj enzim zahteva vitamin tiamin, pirofosfat, jon Mg i FAD (Flavin adenin dinukleotid). ALS katališe:

- kondezaciju dva molekula piruvata do acetolaktata koji dalje dovodi do sinteze valina i
- kondezaciju jednog molekula piruvata sa α -karbobutiratom (oksbutiratom) do α -aceto- β -hidroksibutirata koji dalje dovodi do sinteze izoleucina i leucina (ANDERSON I HIBBERD, 1985; CHALEFF I MAUVAIS, 1984).

INHIBICIJA ALS SULFONILUREAMA I IMIDAZOLINONIMA

U prvim radovima utvrđeno je da sulfoniluree brzo inhibiraju deobu ćelija kod biljaka (RAY 1980, 1990; ROST, 1984), a kasnije su identifikovani osetljivi biohemijski procesi koji izazivaju ovu inhibiciju. U proučavanju ciljanog mesta dejstva korišćene su kulture bakterija. Pošto bakterije imaju veliku sličnost sa biljkama u pogledu proticanja osnovnih životnih procesa LAROSS I SCHLOSS (1984) su koristili bakterije za utvrđivanje primarnog mesta delovanja sulfonilurea. Nekoliko vrsta bakterija su koristili za utvrđivanje njihove osetljivosti prema sulfonilmeturon-metilu. U prisustvu valina sulfonilmeturon-metil inhibira rastenje *Salmonella typhimurium*, ali je inhibicija reverzna u prisustvu izoleucina. Ovakav efekat se ne može ostvariti ako se doda jedna od 18 aminokiselina. Ovi i drugi eksperimenti sugerisali su da sulfoniluree inhibiraju neku od stepenica u biosintezi aminokiselina sa razgranatim lancem. U seriji dobro izvedenih eksperimenata korišćenjem rezistentnog mutanta na sulfonilmeturon-metil utvrđeno je da je

primarno mesto delovanja ovog herbicida acetolaktat sintetaza. Acetolaktat sintetaza (ALS) je dobro poznat i kao acetohidroksikisela sintetaza (AHAS), enzim koji ima ključnu ulogu u biosintezi aminokiselina sa razgranatim lancem kod bakterija, gljiva i viših biljaka.

Inicijalni radovi LAROSS I SCHLOSS (1984) i serija radova ovih i drugih istraživača iz Du Ponta (LAROSS I SIMULSKI, 1984; SCHLOSS, 1984; SCHLOS, 1988; SCHLOSS *i sar.*, 1985; SCHLOSS *i sar.*, 1988; SMITH *i sar.*, 1989) doprineli su karakterizaciji molekularnih i genetičkih detalja inhibicije ALS u bakterijama. U *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* nađeno je više izoenzima acetolaktat sintetaza od kojih je svaki kodiran posebnim genom. Međutim, kod gljiva samo jedan gen kodira ALS. Izoenzim II iz *Salmonella typhimurium* (LAROSS I SCHLOSS, 1984) i izoenzim III iz *Escherichia coli* (LAROSS I SIMULSKI, 1984) pokazuju osetljivost na sulfometuron-metil. Izoenzim II je neosetljiv na ovaj herbicid (LAROSSA I SMULSKI, 1984).

Na osnovu rada LAROSSA I SCHLOSS (1984), RAY (1984) je pretpostavio da je ista aktivnost sulfonilurea u biljkama. Sirovi enzimi iz graška su jako inhibirani hlorsulfuronom. Biljni enzimi su mnogo osetljiviji nego enzimi ALS bakterija i gljiva. Inhibicija deobe ćelija je detektovana već kod koncentracije od 2,8 nM (1 ppb). I_{50} vrednost ili koncentracija hlorsulfurona koja inhibira 50% ALS iz graška za 30 minuta je 21 nM, dok je za sulfonilmeturon-metil iznosila upola manje (12 nM). Nasuprot tome za *Salmonella typhimurium* je iznosila 65, a za gljive 120 nM (LAROSSA I SCHLOSS 1984; FALCO *i sar.*, 1985; FALCO *i sar.*, 1987). Ovi rezultati se slažu sa konstatacijama da su biljke mnogo osetljivije na sulfoniluree nego bakterije i gljive.

ALS iz dve širokolisne i tri travne vrste pokazuje visoku osetljivost na hlorsulfuron. I_{50} vrednost se kreće od 7 do 28 nM (RAY, 1984; CHALEFF I MAUVAIS, 1984). Iako je pšenica visoko tolerantna na hlorsulfuron, ovaj herbicid je jak inhibitor ALS i za ove biljke I_{50} vrednosti su 19-21 nM. Slična situacija je i sa drugim sulfonilurea herbicidima (npr. metsulfuron-metil, tifensulfuron-metil, bensulfuron metil, hlormuron-etil) u pogledu tolerantnosti biljke i osetljivosti ALS. Osnova tolerantnosti ovih biljaka prema sulfonilureama objašnjava se njihovom brzom inaktivacijom ili detoksikacijom u biljkama. (JANJIĆ, 1996, 2002; JANJIĆ *i sar.*, 2002). Korišćenjem iz kulture tkiva regenerisanih mutantnih biljaka dobijena je 1000 puta veća otpornost na hlorsulfuron. Ove mutantne biljke poseduju ALS enzim koji je mnogo manje osetljiv na inhibiciju izazvanu ovim herbicidom.

Isolacijom i karakterizacijom nekoliko mutanata rezistentnih na sulfuron-metil utvrđeno je da visok nivo rezistentnosti potiče od ILV2 gena, koji kodira ALS. ALS iz visoko rezistentnih mutanata nije inhibiran sulfometuron-metilom, u koncentraciji većoj od 30 µg/ml dok je divlji tip ALS veoma osetljiv i ima I_{50} vrednost 45 ng/ml (0,12 µgM). Genetička i biohemijska proučavanja rezistentnih ALS mutanata na sulfoniluree pokazuju da je njihova rezistentnost izazvana jednim dominantnim genim mutacije. Aktivnost ALS enzima se povećava 4-6 puta ako se u osetljivu gljivu unese plazmid koji sadrži divlji tip ILV2 gen. DNA sekvenca gljive ILV2 gena koja kodira ALS je utvrđena kako kod osetljivih tako i kod

rezistentnih gljiva na sulfoniluree (FALCO *i sar.*, 1985). ALS iz rezistentne gljive sadrži jednonlančanu DNK sa promenom baza G:C u A:T što je rezultiralo u supstituciji serina sa prolinom u aminokiselinskom rasporedu (HARDY I GIAQUINTA, 1984). Ova prosta supstitucija aminokiselina je dovoljna za visok nivo rezistentnosti na sulfometuron-metil. Ove strukturne promene gena su bile prva stepenica za genetički inženjering i stvaranje biljaka rezistentnih na sulfoniluree.

U cilju lakšeg razumevanja mehanizme rezistentnosti moguće je grupisati na sledeći način:

- mehanizam rezistentnosti lociran na primarnom mestu delovanja herbicida,
- mehanizam rezistentnosti lociran izvan primarnog mesta delovanja ili zasnovan na metabolizmu herbicida,
- mehanizam rezistentnosti zasnovan na ukrštenoj rezistentnosti lociran na primarnom mestu delovanja herbicida,
- mehanizam rezistentnosti zasnovan na ukrštenoj rezistentnosti lociran izvan primarnog mesta delovanja herbicida,
- mehanizam rezistentnosti zasnovan na multiploj (višestrukoj) rezistentnosti.

Acetolaktat sintetaza je prvi zajednički enzim u biosintezi aminokiselina razgranatog lanca (valina, izoleucina i leucina) koji katališe dve paralelne reakcije: kondenzaciju dva molekula piruvata u acetolaktat i jednog molekula piruvata sa jednim molekulom oksibutirata u acetohidroksibutirat. Acetolaktat je prekursor u sintezi valina i leucina, a acetohidroksibutirat prekursor u sintezi izoleucina (EBERLEIN *i sar.*, 1999). Herbicidi ALS inhibitori sprečavaju da enzim ALS katališe navedene reakcije i na taj način inhibiraju prvu stepenicu u biosintezi valina, izoleucina i leucina. Inače, inhibicija sinteze aminokiselina je relativno nov mehanizam delovanja herbicida. Najmanje 5 različitih grupa herbicida inhibiraju acetolaktat sintetazu a to su: sulfoniluree, imidazolinoni, triazolopirimidini, sulfonilaminokarbonitriazolinoni i piridinoksibenzoati (POWLES I SHANER, 2001; STIDHAM, 1991; MUNITCH *i sar.*, 1987; SHANER *i sar.*, 1990; STIDHAM I SHANER, 1991; SINGH *i sar.*, 1990). Iako su ove dve grupe herbicida strukturalno veoma različite one imaju isti mehanizam delovanja i inhibiraju acetolaktat sintetazu.

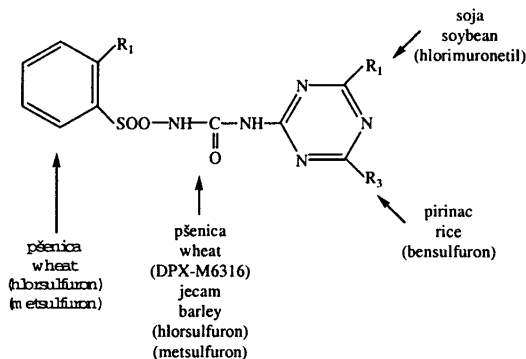
Inhibicija sinteze aminokiseline valina, leucina i izoleucina sigurno izaziva smanjenje sinteze proteina u mladim biljnim delovima (OOKS, 1965). A umanjeње sinteze proteina dovodi do inhibicije deobe ćelija, jer je za izgradnju novih ćelija neophodan gradivni materijal, a posebno su potrebni proteini kao osnovni konstitutivni materijal nove protoplazme. Stara tkiva imaju veće rezerve proteina koji u procesu metabolizma i transaminacije mogu u izvesnom stepenu nadoknaditi potrebe u aminokiselinama. Zato se fitotoksični efekti ovih klasa herbicida uočavaju kasnije, na starim tkivima i organima biljaka.

Prema mišljenju POWLES I SHANER (2001) svaka promena aminokiselina u molekulu ALS izaziva pojavu rezistentnosti koja je kontrolisana preko jednog, kodiranog gena, koji je dominantan ili ima nekompletnu dominantnost (semidominantan). Na osnovu istraživanja BEDBROOK *i sar.*

(1988), MAZUR *i sar.* (1987), MAZUR I FALCO (1989), WIERSNA *i sar.* (1989) utvrđena je sekvenca aminokiselina u molekulu i geni koji kodiraju strukturu ovog molekula. Geni koji kodiraju pojedine aminokiseline su patentirani (BEDBROOK *i sar.*, 1988). Od svih aminokiselina, 24 aminokiseline se mogu koristiti za supstituciju aminokiselina u molekulu ALS na 10 različitih mesta.. Ovakve promene u molekulu ALS izvori su stvaranja rezistentnih formi kao i transgenih biljaka (BEDBROOK *i sar.*, 1988; HAUGHN *i sar.*, 1988; WERSMA *i sar.*, 1989; REED *i sar.*, 1989; HASHEM *i sar.*, 2001).

LOVELL *i sar.* (1996) tvrde da do pojave rezistentnosti mogu da dovedu mutacije na bar pet mesta na ALS enzimu. Te mutacije uključuju zamenu pojedinačnih nukleotida koje se odražavaju na promene aminokiselina u molekulu ALS i tako izazivaju rezistentnost (BOUTSALIS *i sar.*, 1999). Mnogi istraživači su utvrdili da mutacije na kodonu prolina na mestu A ALS gena imaju osnovnu ulogu u razvoju rezistentnosti na ALS inhibitore (HAUGHN *i sar.*, 1998). Kod vrste *Lactuca sativa* L. uzrok rezistentnosti na ALS inhibitore je mutacija, na primarnom mestu delovanja u mestu A ALS gena, koja dovodi do zamene prolina aminokiselinom histidinom (ERERLEIN *i sar.*, 1997; ERERLEIN *i sar.*, 1999). Ista promena je utvrđena i kod rezistentne divlje salate (*Lactuca serriola* L.). Kod nekih drugih rezistentnih vrsta kao npr *Sisymbrium orientale* L. mutacije se dešavaju na prva dva nukleotida u kodonu prolina koja dovode do zamene prolina izoleucinom (SIBONY *i sar.*, 2001; MALLORY-SMITH *i sar.*, 1990), a rezistentnost *Aradopsis thaliana* (L.) Heynh na ALS inhibitore tumači se zamenom prolina serinom (DYER *i sar.*, 1993; HAUGHN I SOMERVILLE, 1996).

Postoji ogromna razlika u osetljivosti biljaka prema herbicidima. inhibitorima ALS. Iso vrednost ili koncentracije sulfonilurea koje inhibiraju ALS enzim za 50% u *in vitro* uslovima u toku 30 minuta se kreću 1-100 nM, a za neke herbicide se kreću oko 10 nM (HALL I DAVINE, 1990). šećerna repa, soja i pamuk su, primera radi, za 4000 puta osetljivije od pšenice, ječma i ovs. Tako štetne koncentracije hlorsulfurona za pšenicu iznose 100 ppb, dok je većina korova osetljiva na koncentracije od 10 ppb. Istovremeno, najosetljivije biljke, kao što su šećerna repa, uljana repica i sočivo, mogu pretrpeti štete i kod koncentracije od 0,1 ppb (BAYER *i sar.*, 1987). Tolerantne biljne vrste sposobne su da metabolišu sulfonilurea herbicide (SHANER *i sar.*, 1984; SHANER I REIDER, 1986; SHANER I ROBSON, 1985). Pšenica je otporna u odnosu na druge kulture. U mnogim eksperimentima je dokazano da tako ogromne razlike između pojedinih biljnih vrsta nisu prouzrokovane razlikama u osetljivosti ALS enzima iz ovih biljaka, niti razlikama u apsorpciji ili translokaciji. Otporne biljne vrste veoma brzo metabolišu sulfoniluree do ne laktivnih proizvoda. Na primeru pšenice, pirinča i soje može se prikazati taj mehanizam detoksikacije. Prva reakcija u detoksikaciji hlorsulfurona u pšenici je hidrosilacija u fenil prstenu, a zatim dolazi do konjugacije sa glukozom. Kod dikotiledonih otpornih biljaka prva reakcija je hidrosilacija metil grupe u prstenu triazina, a zatim na tom mestu dolazi do konjugacije sa glukozom. Obrazovani glukozidi, i u jednom i u drugom slučaju, nemaju herbicidnu aktivnost. Takve razlike su sumirane i predstavljene na šemi 1.



Šema 1. - Mesto inaktivacije molekula sulfonilurea (BROWN I NEIGBOKS, 1987; REDDY I BENDIXEN 1989)
 Schema 1. - Place of inactivation of sulphonilurea molecule (BROWN I NEIGBOKS, 1987; REDDY AND BENDIXEN 1989)

Prema tome, osnova otpornosti pojedinih vrsta prema herbicidima ALS inhibitorima zavisi od mesta metabolizma molekula, brzine metabolizma i brzine formiranja konjugata sa umanjenom herbicidnom aktivnošću. (RELTON *i sar.*, 1986). Zbog specifičnog mehanizma delovanja i ogromnih razlika u pogledu osetljivosti pojedinih biljnih vrsta, danas se intenzivno istražuje mogućnost dobijanja otpornih kultivara na ove herbicide primenom kulture tkiva i ćelija i drugih tehnika genetičkog inženjeringa. Još 1988. godine dobijene su biljke duvana koje su bile više od 1000 puta otpornije od normalnih kultura (HAUGHN *i sar.*, 1988; CHALEFF I RAY, 1984; GABARD *i sar.*, 1989). Tehnikom genetičkog inženjeringa izolovan je gen odgovoran za otpornost i on se prenosi u druge biljke (MAZUR *i sar.*, 1987). Ovakvim istraživanjima stvaraju se neslućene mogućnosti za rešavanje mnogih problema u suzbijanju korova, koristeći na taj način stvorene razlike u osetljivosti između pojedinih biljnih vrsta.

Studije metabolizma, međutim, pokazale su visoku pozitivnu korelaciju između tolerantnosti i metabolizma (¹⁴C)-hlorosulfurona. U visoko osetljivoj šećernoj repi samo 3% (¹⁴C)-hlorosulfurona je metabolizirano u listu za 24 sata, dok je u pšenici za ovo isto vreme metabolizirano 95%. Isto tako, velike razlike u brzini metabolizma postoje kod tolerantnih travnih biljaka (ječam, divlji ovas, *Poa annua* L.) i osetljivih širokolisnih biljaka (pamuk, soja, slačica) na (¹⁴C)-hlorosulfuron. Hlorosulfuron se prvo metaboliše u pšenici i drugim travama do 5-hidroksifenil intermedijera, a onda brzo konjuguje sa glukozom. Pošto se nije mogao detektovati 5-hidroksihlorosulfuron u ekstraktu pšenice to ukazuje da se finalna konjugacija odvija veoma brzo. U izolatu pšenice otkriveno je prisustvo aktivne glukoziltransferaze za konjugaciju. U ovim eksperimentima je utvrđeno da je hlorosulfuron preko 200 puta jači inhibitor ALS nego njegov konjugat. HAGEMAN I BEHRENS (1984) su našli da je osetljivi *Abutilon theophrasti* Medic. preko 20000 puta osetljiviji na hlorosulfuron nego tolerantni *Solanum nigrum* L. Razlike u apsorpciji i translokaciji nisu dovoljne da objasne ove fenomene. Kao

i kod tolerantnih trava (SWETSER *i sar.*, 1982) tako i ovde *Solanum nigrum* L. mnogo brže metaboliše hlorsulfuron nego *Abutilon theophrasti* Medic. Posle 72 sata 81% (¹⁴C)-hlorsulfurona je bilo metabolizirano u *Solanum nigrum* L., a samo 7% u osetljivom *Abutilon theophrasti* Medic.

Hlorimuron-etil se inaktivira u soji dehlorovanjem u položaju 2 triazinskog prstena i stvaranjem konjugata sa homoglutationom (BROWN i NEIGHBOKS, 1987). Poluživot hlorimuron-etila u lišću soje je samo 2-4 sata u poređenju sa 30 sati u *Ipomea spp* i *Xanthium spp*. U pirinču bensulfuron-metil se metaboliše promenom 6-metoksi supstituenta u R₃ položaju triazinskog prstena do hidroksi grupe. Ovaj metabolit je otprilike 3000 puta manje aktivnosti kao ALS inhibitor nego izvorni herbicid. Interesantno je istaći da indijski pirinač mnogo brže metaboliše bensulfuron-metil nego japanski pirinač.

Tako je utvrđeno da su mnoge gajene i korovske biljke tolerantne na ALS inhibitore (ANDERSON *i sar.*, 1998). Prirodna otpornost (tolerantnost) se objašnjava brzom detoksikacijom molekula herbicida, prisustvom podesnih mesta za metabolizam u molekulu, kratkim životom nastalih intermedijera u procesu metabolizma i formiranjem konjugata sa značajno smanjenom herbicidnom aktivnošću (ANDERSON *i sar.*, 1998). Znači, prirodna tolerantnost biljaka na ALS inhibitore pripisuje se metabolizmu herbicida, a rezistentnost osetljivost ALS enzima na herbicide.

Ukrštena rezistentnost (rezistentnost na više herbicida sa istim mehanizmom delovanja) utvrđena je kod nekih korovskih vrsta (*Datura innoxia* Mill., *Bromus tectorum* L. i *Kochia scoparia* L.) na sulfoniluree i imidazolinone (LOVELL *i sar.*, 1996; MALLORY-SMITH *i sar.*, 1999). Za razliku od drugih herbicida kod herbicida ALS inhibitora iako se rezistentnost bazira na primarnom mestu delovanja ona može biti veoma različita s obzirom na mesto gde se dešavaju mutacije. Zato različite hemijske grupe koje inhibiraju ALS enzim imaju različita primarna mesta delovanja, jer postoje razlike u mestu supstitucije aminokiselina u molekulu ALS. SAARI *i sar.* (2001) ukazuju da je primarno mesto delovanja kod ukrštene rezistentnosti između sulfonilurea i triazolopirimidina zajedničko i odnosi se na prolin koji se nalazi na 197. mestu u molekulu. Ovo mesto prolina čijom zamenom jednom od šest sledećih aminokiselina: alanin, arginin, glutamin, leucin, serin i treonin može doći do rezistentnosti. Primarno mesto delovanja kod ukrštene rezistentnosti između sulfonilurea i imidazolinona nije utvrđeno.

Multipla (višestruka) rezistentnost je pojava rezistentnosti na herbicide različitog mehanizma delovanja. Ovaj oblik rezistentnosti je utvrđen kod *Kochia scoparia* L. na triazine (inhibitore fotosinteze) i sulfoniluree (inhibitore ALS). (FOES *i sar.*, 1999). Višegodišnja primena triazina dovela je do pojave rezistentnosti *Kochia scoparia* L., ali je ova vrsta odmah postala rezistentna i na sulfoniluree. To ukazuje da se kod *Kochia scoparia* L. razvila multipla rezistentnost na dve vrste herbicida različitog mehanizma delovanja. Rezistentna vrsta ima D₁ neosetljiv protein na triazinske herbicide usled substitucije glicina sa serinom na poziciji 264. Uz to, izmena leucina sa triptofanom na poziciji 570 kod ALS enzima dovela je do modifikacije ALS enzima koji je time postao neosetljiv

na herbicide iz grupe sulfonilurea i imidazolinona. Postoje i drugi primeri sličnih oblika multiple rezistentnosti koji se navode u literaturi kao što je multipla rezistentnost *Amaranthus rudis* L. (na triazine i ALS inhibitore) (FOES *i sar.*, 1998; SPAGUE *i sar.*, 1997a, 1997b) i *Lolium rigidum* (na ALS inhibitore i inhibitore ACC-aze odgovorne za biosintezu lipida) (KOTOULA-SYKA *i sar.*, 2002).

LITERATURA

- ALVARADO, S. I., GREWS, A. D., WEPFLO, P., DOEHNER, R. F., BRADY, D. M., GANGE, D. M., LITTLE, D. L. (1989): Benzenesulfonyl carboxamide compounds useful as herbicidal agents. Us Patent Number, 4: 883-914.
- ANDERSON, D. D., NISSEN, S. J., MARTIN, A. R., ROETH, F. W. (1998): Mechanism of primisulfuron resistance in shattercane (*Sorghum bicolor*) biotype. *Weed Science*, 46: 158-162.
- ANDERSON, P. C., HIBBERD, K. A. (1985): Evidence for the inactivation of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. *Weed Science*, 33: 479-485.
- BEDBROOK, J., CHALEFF, R. S., FALCO, S. C., MAZUR, B. J., YADAV, N. (1988): Nucleic acid Fragment Herbicide Resistant Plant Acetolactate Synthase. Eur. Patent Appl. 0257993.
- BEYER, F. M., BROWN, H. M., DUFFY, M. J. (1987): Sulfonylurea Herbicide Soil Relations. Proc. Bright. Crop. Protect. Conference-Weeds, 1: 531-540.
- BOUTSALIS, P., POWLES, S. B. (1995): Resistance of dicot weed to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in Australia. *Weed Research*, 35: 149-155.
- BROWN, H. M., NEIGHBOKS, S. M. (1987): Soybean metabolism of chorimuron ethyl: physiological basis for soybean selectivity. *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 29: 112-120.
- CHALEFF, R. S., MAUVAIS, C. V. (1984): Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224: 1443-1445.
- CHALEFF, R. S., RAY, T. B. (1984): Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223: 1148-1151.
- EBRLEIN, C. V., GUTTIERI, M., MALLORY-SMITH, C. A., THILL, D., BEARG, R. (1997): Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistance prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Science*, 45: 212-217.
- EBRLEIN, C. H., GUTTIERI, M., BERGER, PH., FELLMAN, J., MALLORY-SMITH, C. A., THILL, D., BEARG, R., BELKNAP, W. (1999): Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. *Weed Science*, 47: 383-392.
- FALCO, S. C., DUMAS, K. S. (1985): Genetic Analysis of Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Resistant to the Herbicide Sulfometuron methyl. *Genetica*, 109: 21-35.
- FALCO, S. C., KNOWLTON, R. A., LAROSSA, R. A., SMITH, J. K., MAZUR, B. J. (1987): Herbicides that inhibit amino acid biosynthesis: The sulfonylureas-a case study. 149-151. In: 1987 British Crop Prot. Conf.-Weeds, Surrey, U. K., BCPC Publications.
- GABARD, J. M., CHAREST, P. J., IYER, V. N., MIKI, B. L. (1989): Cross resistance to short residual sulfonylurea herbicides in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.*, 91: 574-580.
- GERWICK, B. C., MIRELES, L. C., EILERS, R. J. (1993). Rapid Diagnosis of ALS/AHAS-resistant Weeds. *Weed Technology*, 7: 519-524.
- GERWICK, B.C., SUBRAMANIAN, M.V., LONEY-GALLANT, V.J. (1990): Mechanism of Action of the 1,2,4-triazol [1,5- α] pyrimidines. *Pestic. Sci.*, 29: 357-364.
- HAGEMAN, L. H., BEHRENS, R. (1984): Basis for Response Differences of Two Broadleaf Weeds to Chlorsulfuron. *Weed Sci.*, 32: 162-167.
- HALL, L. M., DEVINE, M. D. (1990): Cross Resistance of a Chlorsulfuron-Resistant Biotype of *Stellaria media* to a Triazolopyrimidine Herbicide. *Plant Physiol.*, 93: 962-966.
- HASHEM, A., BOWRAN, D., PIPER, T., DHAMMU, H. (2001): Resistance of Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in the Western Australia West Belt. *Weed Technology*, 15: 68-74.

- HAUGHN, G. W., SMITH, J., MAZUR, B., SOMERVILLE, C. (1988): Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Mol. Gen. Genet.*, 211: 266-271.
- HAUGHN, G., SOMERVILLE, C. (1986): Sulfonylurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet.*, 204: 430-434.
- HAWKES, T. R. (1989): Studies of herbicides which inhibit chain amino acid biosynthesis. 129-136. In: Prospects for Amino Acid Biosynthesis in Crop Protection and Pharmaceutical Chemistry. (Coping, L.G., Dalziel, J., Dodge, A.D., eds) British Crop Protection Council Farnham, Surrey, UK.
- HEAP, H. M. (1999): International survey of herbicide-resistant weeds: lessons and limitations. The 1999 Brighton conference-Weeds, 769-776.
- JANJIĆ, V. (1996): Savremena istraživanja prirode i delovanja herbicida. Zbornik radova Petog kongresa o korovima, Banja Koviljača, 74-121.
- JANJIĆ, V. (2002): Sulfonyluree. Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija i Akademija nauka i umjetnosti Republike Srpske, Beograd, 1-189.
- JANJIĆ, V., JOVANOVIĆ, LJ., BLANUŠA, T., MILOŠEVIĆ, D. (2002): Sulfonylurea herbicides-Mode of Action. In: Plant Physiology in the New Millennium (eds. S. Quarrie, B. Krstić and V. Janjić). ARI SERBIA, Belgrade, 101-109.
- JAPANESE Patent Number J6 3196-570-A.
- JONES, A. V., YOUNG, R. M., LETO, K. J. (1985): Subcellular localization and properties of acetolactate synthase, target site of the sulfonylurea herbicides. *Plant Physiol.*, 77: 287-293.
- LAROSS, R. A., SCHOSS, J. V. (1984): The herbicide sulfometuron methyl is bacteriostatic due to inhibition of acetolactate synthase. *J. Biol. Chem.*, 259: 8753-8757.
- LAROSSA, R. A., SCHLOSS, J. V. (1984): The Sulfonylurea Herbicide Sulfometuron Methyl Is: an Extremely Potent and Selective Inhibitor of Acetolactate Synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, 14, 8753-8757.
- LEVITT, G. (1982): U. S. Pat. 4. 339. 267.
- LEVITT, G. (1984): U. S. Pat. 4. 435. 206.
- LOVELL, S. T., WAX, L. M., HORAK, M. J., PETERSON, D. E. (1996): Imidazolinone and Sulfonylurea Resistance in a Biotype of Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed Science*, 44: 789-794.
- MALLORY-SMITH, C. A., THILL, D., DIAL, M. J. (1990): Identification of Sulfonylurea Herbicide-Resistant Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 4: 163-168.
- MALLORY-SMITH, C.A., THILL, D., DIAL, M.J., ZEMETRA, R.S. (1990): Interchange of Sulfonylurea Herbicide Resistance in *Lactuca spp.* *Weed Technology*, 4: 787-790.
- MAZUR, B. J., CHUI, C-F., SMITH, J. K. (1987): Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol.*, 85: 1110-1117.
- MAZUR, B. J., FALCO, S. C. (1989): The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 40: 441-470.
- MIFLIN, M. J. (1971): Cooperative feedback control of barley, acetohydroxyacid synthase by leucine, isoleucine, and valine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146: 542-550.
- MIFLIN, M. J., CAVE, P.R. (1972): The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. *J. Exp. Bot.*, 23: 511-516.
- MUHITCH, M. J., SHANER, D. L., STIDHAM, M. A. (1987): Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants. *Plant Physiol.*, 83: 451-456.
- OAKS, A. (1965): The synthesis of leucine in maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 111: 79-89.
- POWLES, S. B., SHANER, D.L. (2001): *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC Press, London, New York.
- PRIMIANI, M. M., COTTERMAN, J. C., SAARI, L. L. (1990): Resistance of *Kochia (Kochia scoparia)* to Sulfonylurea and Imidazolinone Herbicides. *Weed Technol.*, 4: 169-172.
- RAY, T. B. (1980): Studies on the mode of action of DPH-4189. *Weeds*, 1(7): 14.
- RAY, T. B. (1984): Site of action chlorsulfuron. *Plant Physiol.*, 75: 827-831.

- REDDY, K. N., BENDIXEN, L. E. (1989): Toxicity, absorption, translocation and metabolism of soil-applied chlorimuron in yellow and purple nutsedge (*Cyperus esculentus* and *C. rotundus*). *Weed Sci.*, 37: 147-151.
- REED, W. T., SALADINI, J. L., COTTERMAN, J. S., PRIMIANI, M. M., SAARI, L. (1989): Resistance in weeds to sulfonylurea herbicides. Brighton Crop Protection Conference-Weeds, 295-300.
- RELTON, J. M., WALLSGROVE, R. M., BOURGIN, J. P., BRIGHT, S. V. J. (1986): Altered feedback sensitivity of acetohydroxyacid synthase from valine resistant mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta*, 169: 46-50.
- SAARI, L. L., COTTERMAN, J. C., PRIMIANI, M. M. (1990): Mechanism of Sulfonylurea Herbicide Resistance in the Broadleaf Weed, *Kochia scoparia*. *Plant Physiol.*, 93: 55-61.
- SAARI, L. L., COTTERMAN, J. C., SMITH, W. F., PRIMIANI, M. M. (1992): Sulfonylurea Herbicide Resistance in Common Chickweed, Perennial Ryegrass and Russian Thistle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 42: 110-118.
- SAURES, R. F. (1983): U. S. Pat. 4. 420. 325.
- SCHLOSS, J. V. (1984): Interaction of the herbicide sulfometuron methyl with acetolactate synthase: a slow binding inhibitor. 737-740 In: *Flavins and Flavoproteins*. (Bray, R. S., Engel, P. C., Mayhew, eds). Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- SCHLOSS, J.V. (1988): Significance of slow-binding enzyme inhibition and its relationship to reaction-intermediate analogues. *Acc. Chem. Res.*, 21: 348-353.
- SCHLOSS, J.V., CISKANIK, L.M., VAN DYK, D.E. (1988): Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature*, 331: 360-362.
- SCHLOSS, J.V., VAN DYK, D.E., VASTA, J.F., KUTNY, R.M. (1985): Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB 101/pDU9. *Biochemistry*, 24: 4952-4959.
- SELBY, T. P., WOLF, A. D. (1983): U. S. Pat. 4. 421. 550.
- SHANER, D. L., ANDERSON, P. C., STIDHAM, M. A. (1984): Imidazolinone: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, 76: 545-546.
- SHANER, D. L., REIDER, M. L. (1986): Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 243, 997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 25: 248-257.
- SHANER, D. L., SINGH, B. K., STIDHAM, M. A. (1990): Interaction of imidazolinone with plant acetohydroxy acid synthase: Evidence for in vivo binding and competition with sulfometuron methyl. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1279-1282.
- SHANNER, D. L., ROBSON, P. A. (1985): Absorption, Translocation and Metabolism of AC 252 214 in Soybean (*Glycine max*), Common Cocklebur (*Xanthium strumarium*), and Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Sci.*, 33: 469-471.
- SHARMA, R.K., MAZUMDER, R. (1970): Purification, properties, and feedback control of L-treonine dehydratase from spinach. *J. Biol. Chem.*, 245: 3008-3014.
- SIBONY, M., MICHEL, A., HAAS, H.U., RUBIN, B., HURLE, K. (2001): Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Research*, 41: 509-522.
- SINGH, B.K., NEWHOUSE, K.E., STIDHAM, M.A., SHANER, D.L. (1990): Acetohydroxyacid synthase-imidazolinone interaction. In: *The Biosynthesis of Branched-chain Amino Acids*. (Barak, A., Schloss, J.V., Chipman, M., eds.) WCH publishers.
- SMITH, J. K., SCHLOSS, J. V., MAZUR, B. J. (1989): Functional expression of plant acetolactate synthase genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86, 4179-4183.
- SPRAGUE, C. L., STOLLER, E. W., WAX, L. M. (1997): Response of acetolactate synthase (ALS)-resistant biotype of *Amaranthus rudis* to select ALS-inhibiting and alternative herbicides. *Weed Research*, 37: 93-101.
- SPRAGUE, C. L., STOLLER, E. W., WAX, L. M., HORAK, M. J. (1997): Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to select ALS- inhibiting herbicides. *Weed Science*, 45: 192-197.
- STIDHAM, M. A. (1991): Herbicides that Inhibit Acetohydroxyacid Synthase. *Weed Science*, 39: 428-434.
- STUDHAM, M. A., SHANER, D. L. (1990): Imidazolinone inhibition of acetohydroxyacid synthase *in vitro* and *in vivo*. *Pest. Sci.*, 29: 335-340.

- SUBRAMANIAN, J. V., LONEY, V., PAO, L. (1989): Mechanism of action of 1,2,4-triazolo[1,5- α]pyrimidine sulfonamide herbicides. 97-100. In: British Crop Protection Monograph 42. Copping, (L. G., Dalziel, J. Dodge, A. D., eds.) Farnham, Surrey, U. K.
- SWEETSER, P. B., SCHOW, G. S., HUTCHISON, J. M. (1982): Metabolism of chlorsulfuron by plants - biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18-23.
- TOPEL, W., KRISTINSSON, H., MEYER, W. (1983): Australian Pat. Appl. 16890/83.
- WIERSMA, P. A., SCHMIEMANN, M. G., CONDIE, J. A., CROSBY, W. L., MOLONEY, M. M. (1989): Isolation expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.*, 219: 413-420.
- ZIMMERMAN, W. T. (1983): U. S. Pat. 4. 487. 626.

Primljeno 25. marta 2004.

Odobreno 10. aprila 2004.

**GENETIC AND BIOCHEMICAL BASIS OF WEED RESISTANCE
TO ALS-INHIBITING HERBICIDES**

Vaskrsija JANJIĆ¹, Ljiljana RADIVOJEVIĆ¹, Siniša MITRIĆ² and Goran MALIDŽA

¹ARI SERBIA - Pesticide and Environmental Research Centre, Zemun

²Faculty of Agriculture, Banja Luka

³Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

S u m m a r y

Genetic and biochemical bases of resistance of weed plants to herbicides that inhibit acetolactate synthetase (ALS) are reviewed. Resistance to sulfonyl urea and imidazolinone herbicides and their new derivative products, namely triazolopyrimidin sulfoanilide, pyrimidinil oxybenzoi acid, non-aromatic imidazolinone and sulphonyl carboxiamide is discussed. The main biosynthetic pathway of amino acids with branching chains (valine, isoleucine and leucine) is shown, as well as the herbicides' mechanisms of inhibition of ALS enzyme. Mechanisms of weed resistance to ALS inhibitors are discussed from the aspects of mechanism of resistance located on the primary site of activity, mechanism of resistance based on metabolism of herbicides, mechanism of resistance based on cross-resistance located on the primary site of activity and outside the primary site. Special attention is focused on the mechanism of resistance based on multiple resistance. For all cases of developing resistance, examples are cited of instances of change and mutation on the primary site of activity in region A of the ALS gene leading to an exchange of individual amino acids within ALS molecules. Special attention is focused on natural plant tolerance to ALS inhibitors, which is attributed to herbicide metabolism, brief lif span of created intermediaries during the metabolic process and forming of conjugates with significantly reduced herbicide activity.

Received March 25, 2004

Accepted April 10, 2004