



茵草对ALS抑制剂的抗性机理研究

The resistance of *Beckmannia syzigachne* (Steud.)
Fern to ALS inhibitors

主讲人：韩玉皎

中国农业科学院植物保护研究所

Email : hanyujiao1989@sina.cn

目录

- 背景材料
- 研究思路
- 分析过程
- 研究计划
- 参考文献
- 致谢



(一) 背景资料

1. 茵草



所谓杂草，就是生于其非生之地的植物。

利用价值

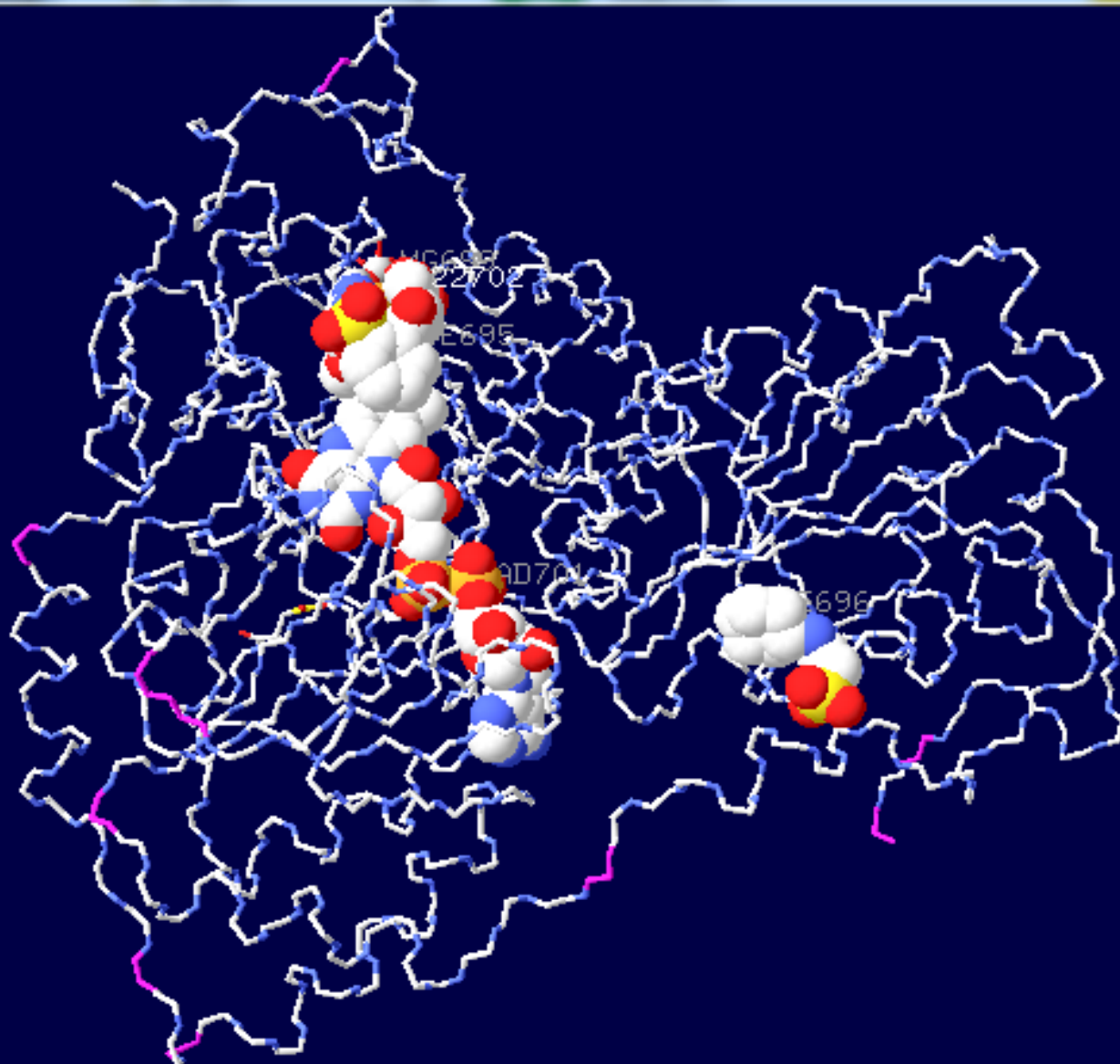
- 饲草
- 湿地改造
- 为野生动物提供食物和避所
- 对水稻病原菌敏感

危害情况

- 稻茬麦田和油菜田主要杂草
- 水稻细菌性褐斑病及锈病的寄主

2.ALS

- ALS: **A**cetolactate **s**ynthase (AHAS)
乙酰乳酸合成酶 (乙酰羟酸合成酶)
- 蛋白家族: TPP enzyme family
- 配基: FAD
Flavoprotein
Magnesium
Metal-binding
Thiamine pyrophosphate



基因结构

Map Detail
Image

Chr3:18001312..18003581



18002k

18003k

Protein Coding Gene Models

AT3G48560.1 (ALS, AHAS, CSRL, IMR1, TZP5)



亚细胞定位：叶绿体（植物的 ALS 是由细胞核染色体 DNA 编码并固定于叶绿素中的一种黄素蛋白。）



TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

targetp v1.1 prediction results

Number of query sequences: 1

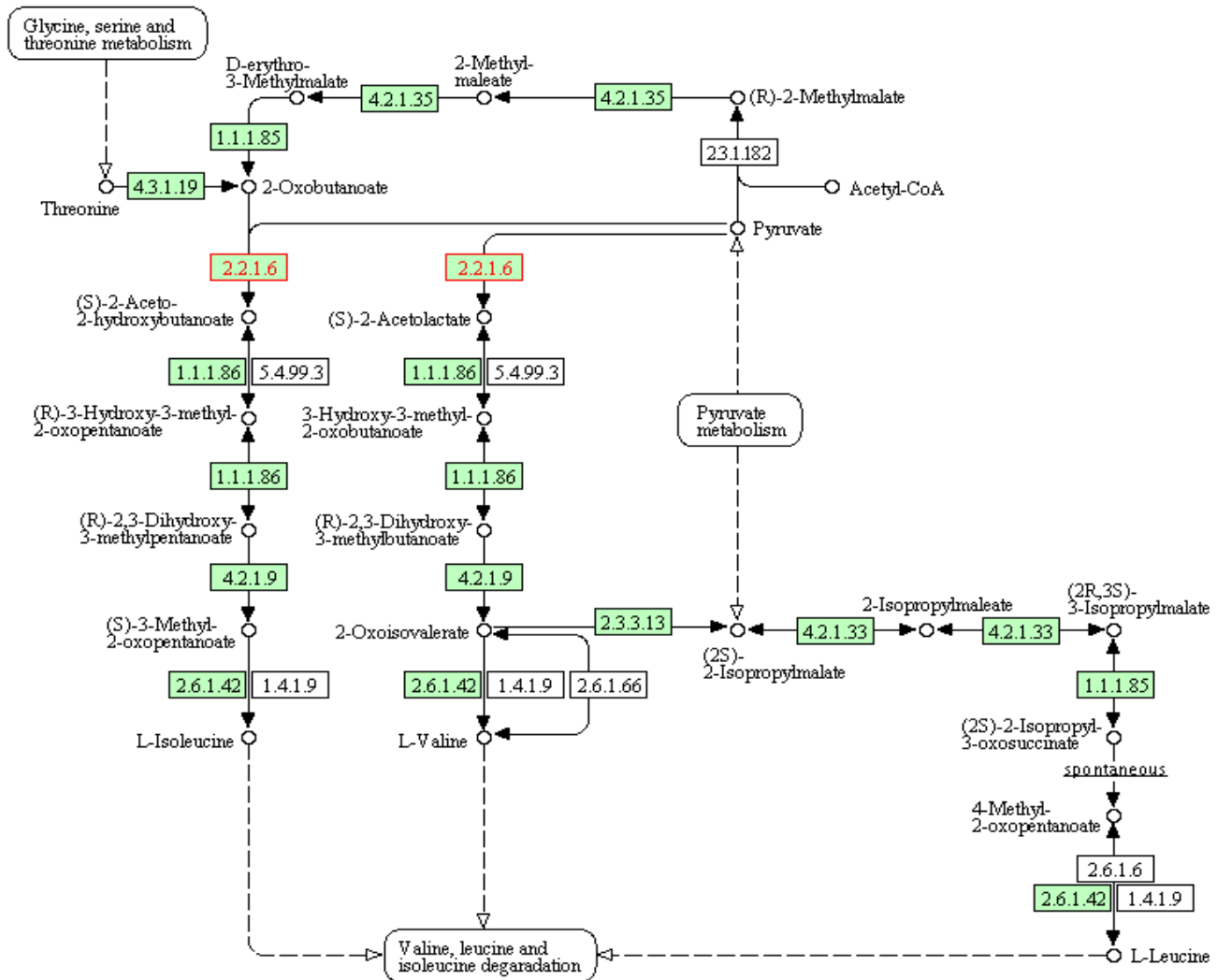
Cleavage site predictions not included.

Using PLANT networks.

Name	Len	cIP	mIP	SP	other	Loc	RC
sp_P17597_ILVB_ARATH	670	0.976	0.033	0.002	0.059	C	1
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

功能：诱导植物和微生物体内缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸,这3种支链氨基酸生物合成过程中第一阶段的关键性酶，它催化两个丙酮酸形成乙酰乳酸和CO₂或催化丙酮酸和A-丁酮酸形成乙酰羟丁酸和CO₂

VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS

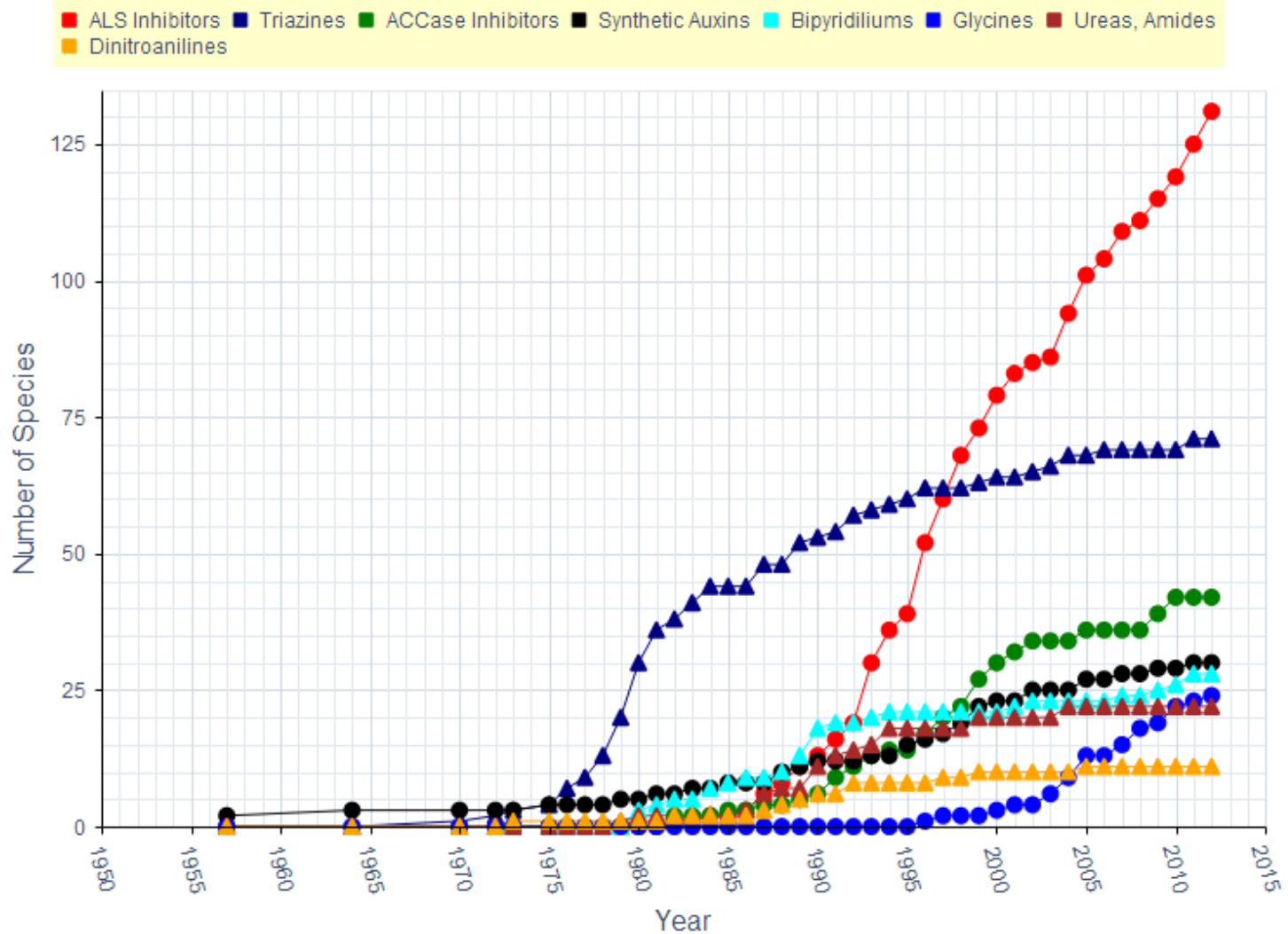


3.ALS抑制剂

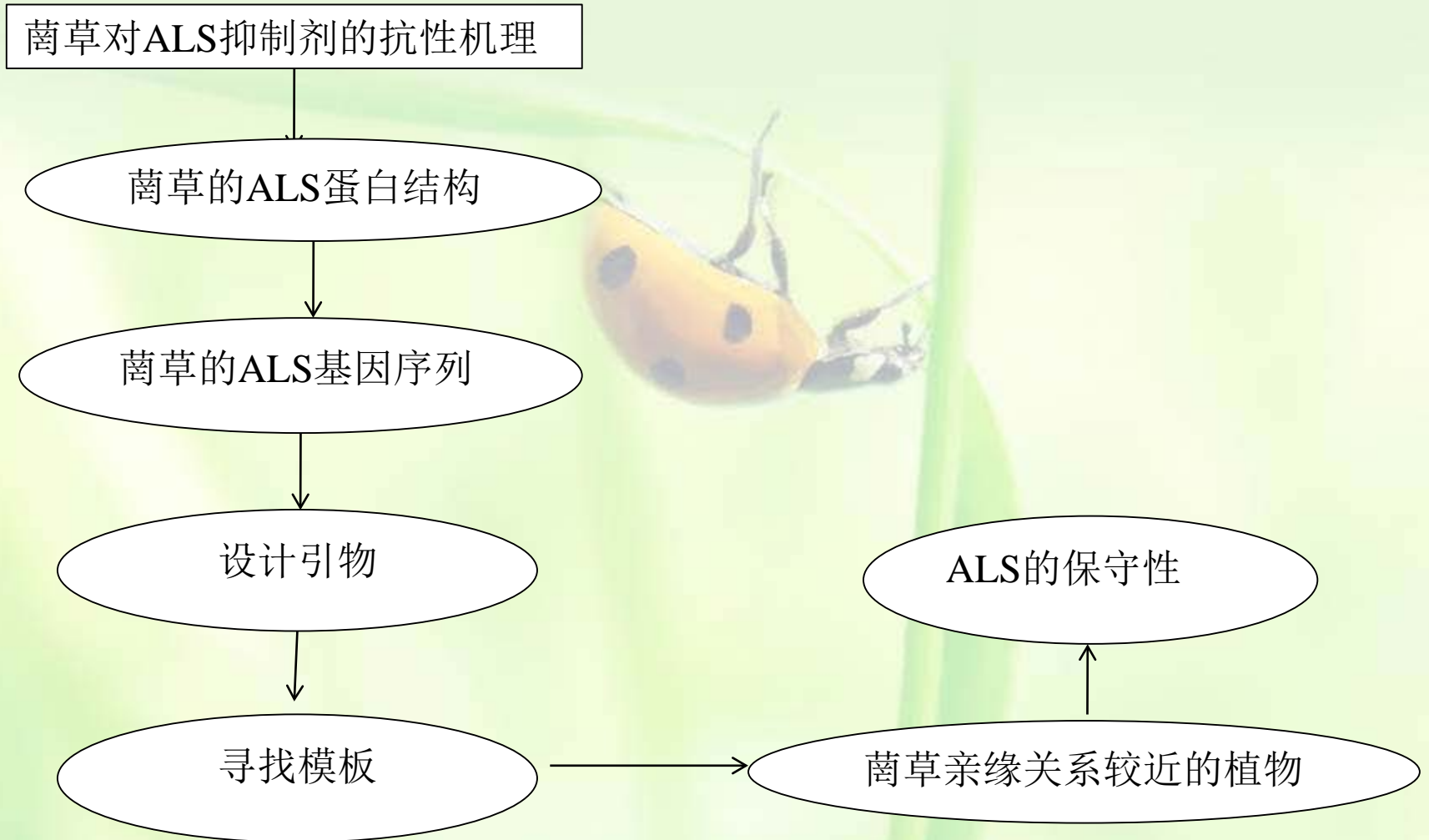
- 1982年，氯磺隆作为磺酰脲类除草剂的第一个品种在美国注册登记，随后推广使用。
- 目前研制开发的ALS抑制主要有五大类：
 - 磺酰脲类(Sulfonylureas, SU)
 - 咪唑啉酮类(Imidazolinones, IMI)
 - 嘧啶硫代苯甲酸酯类(Pyrimidinylthiobenzoates, PTB)
 - 三唑并嘧啶类(Triazolopyrimidines, TP)
 - 磺酰胺羰基三唑啉酮类
(Sulfonylaminocarbonyltriazolinone, SCT)
- 作用机理：ALS 抑制剂通过抑制生物体内的 ALS,导致支链氨基酸无法合成,从而细胞不能完成有丝分裂,最终植株生长停止,乃至死亡

杂草抗药性

Chronological Increase in Resistant Weeds Globally



(二) 研究思路



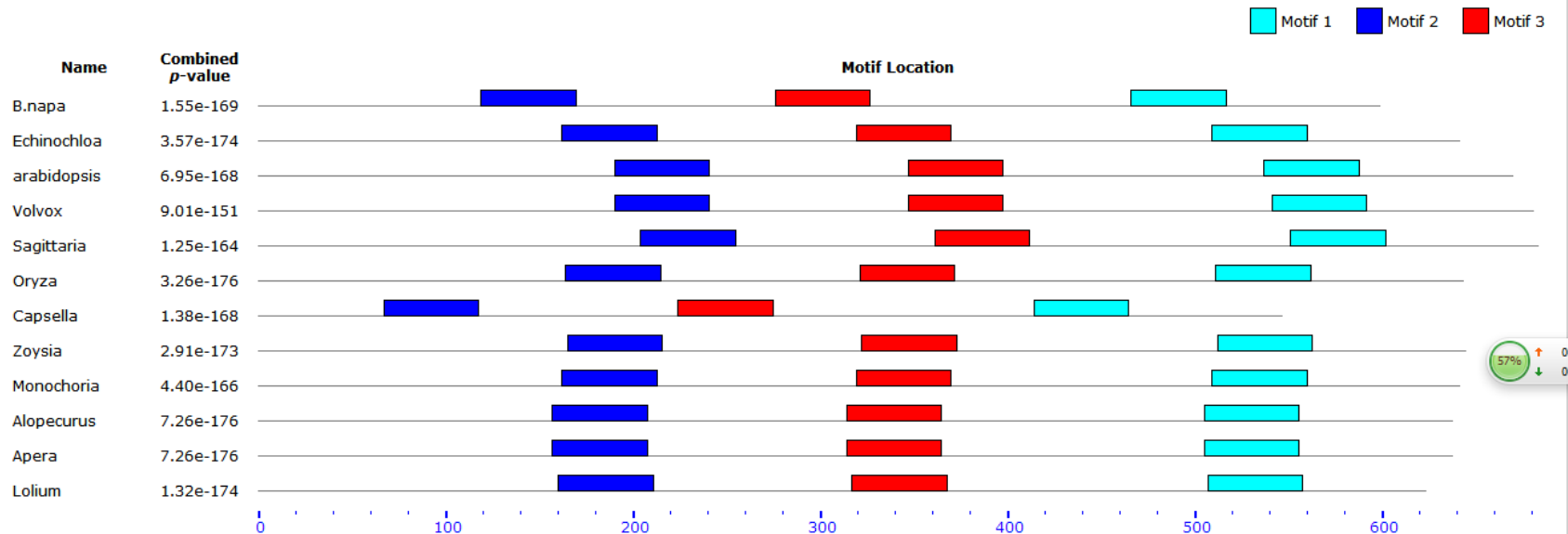
(三) 分析过程

1. 序列保守性 MEME motif 预测

Combined Block Diagrams ?

Non-overlapping sites with a p -value better than 0.0001.

The height of the motif "block" is proportional to $-\log(p\text{-value})$, truncated at the height for a motif with a p -value of $1e-10$.
Click on any row to highlight sequence in all motifs. The motif blocks have tool tips with more information.

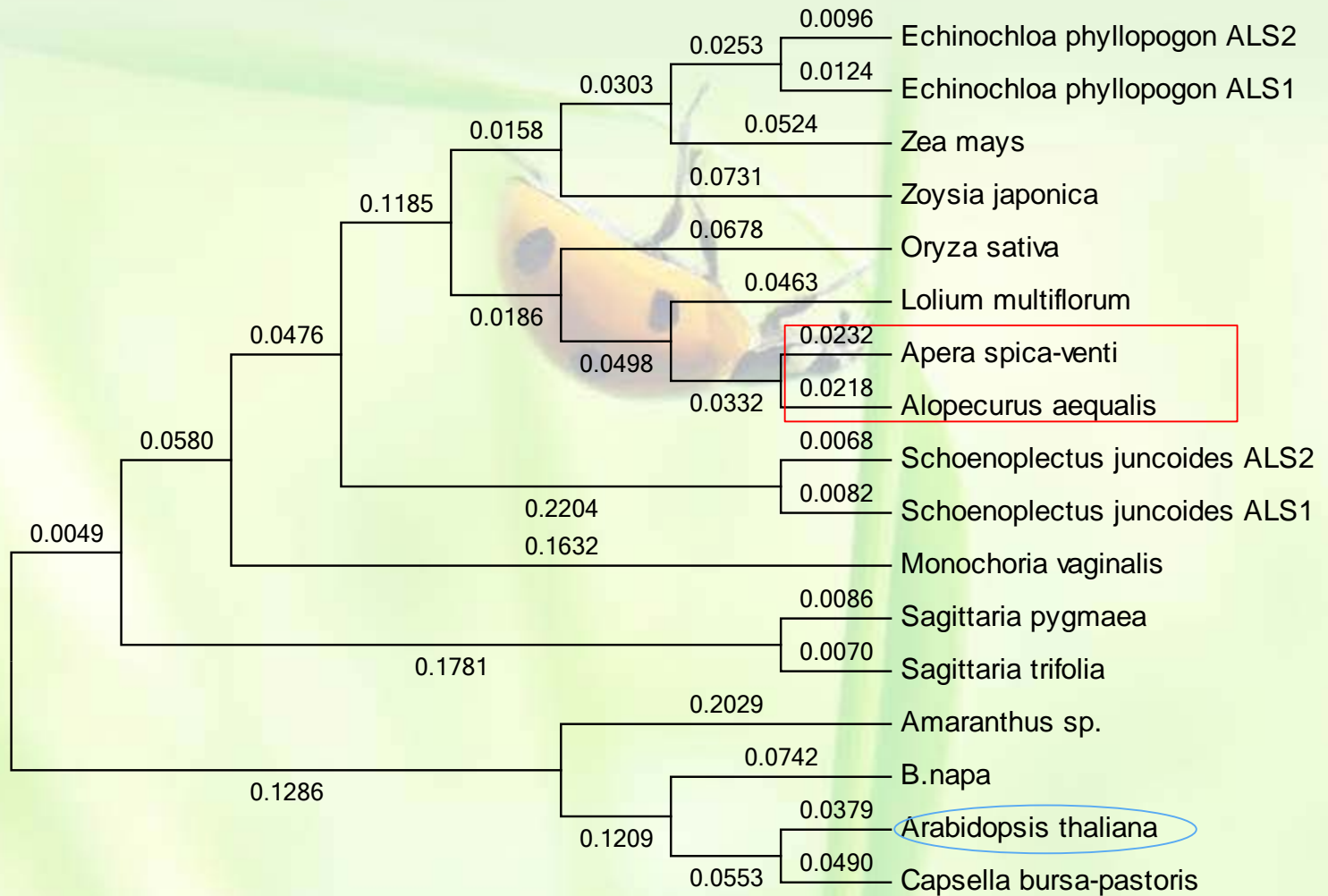


57% ↑ 0
↓ 0

2.进化树构建

▼ Taxonomic Groups [List]

- [-] eukaryotes (578)
 - [-] fungi (254)
 - [-] ascomycetes (231)
 - [-] basidiomycetes (23)
 - [-] green plants (201)
 - [-] land plants (181)
 - [-] vascular plants (176)
 - [-] mosses (5)
 - [-] green algae (20)
 - [-] animals (98)
 - [-] chordates (66)
 - [-] arthropods (14)
 - [-] more... (18)
- Perkinsida (7)
- cellular slime molds (5)
- oomycetes (4)
- apicomplexans (4)
- diatoms (2)
- ciliates (1)
- dinoflagellates (1)
- Capsaspora (1)
- bacteria (1)



3.设计引物

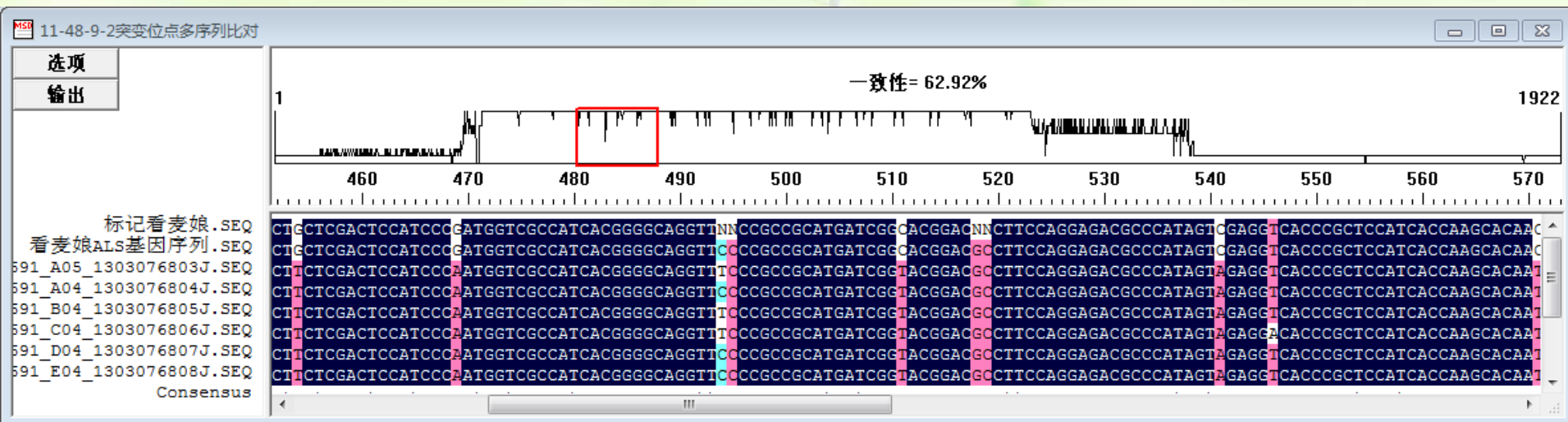
模板：看麦娘 (*Alopecurus aequalis*) ALS基因序列

引物设计原则：引物长度、3' 端、GC含量、Tm值、 ΔG 、引物二聚体及发夹结构等

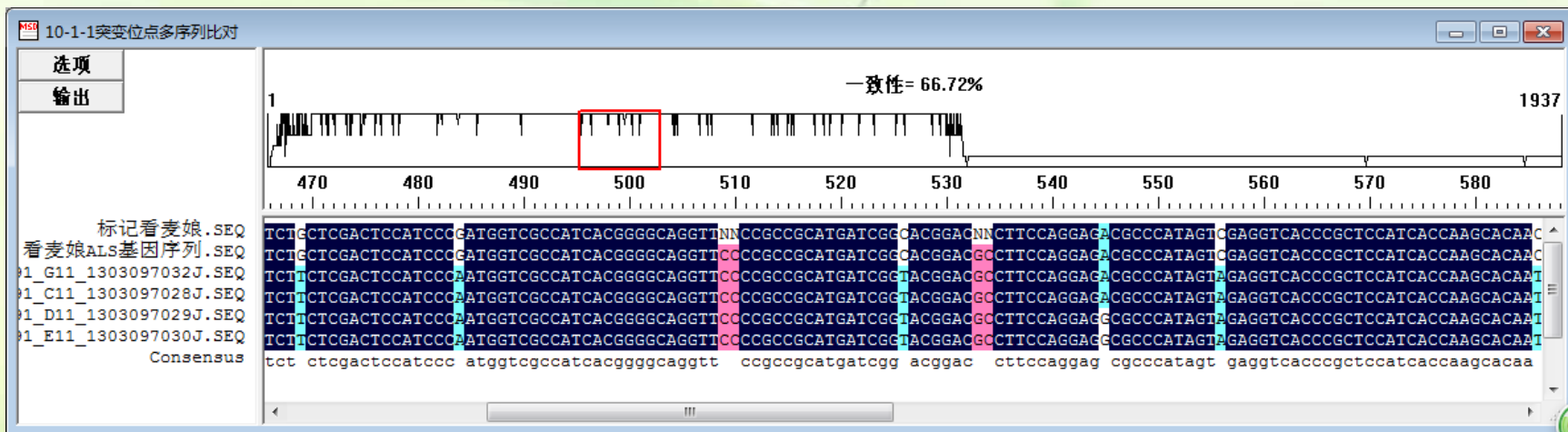
引物设计软件：primer premier 5.0
Oligo6

4. 扩增序列测序

DNAMAN V6



197位脯氨酸 (CCC) 部分突变为丝氨酸(TCC)
205位没有发生突变



197位和205位没有发生突变

5.ALS结构分析

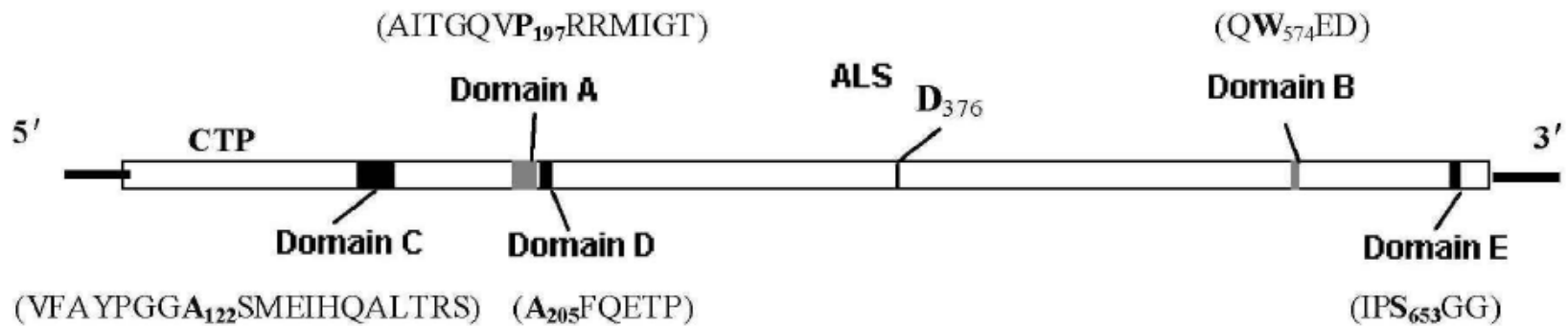
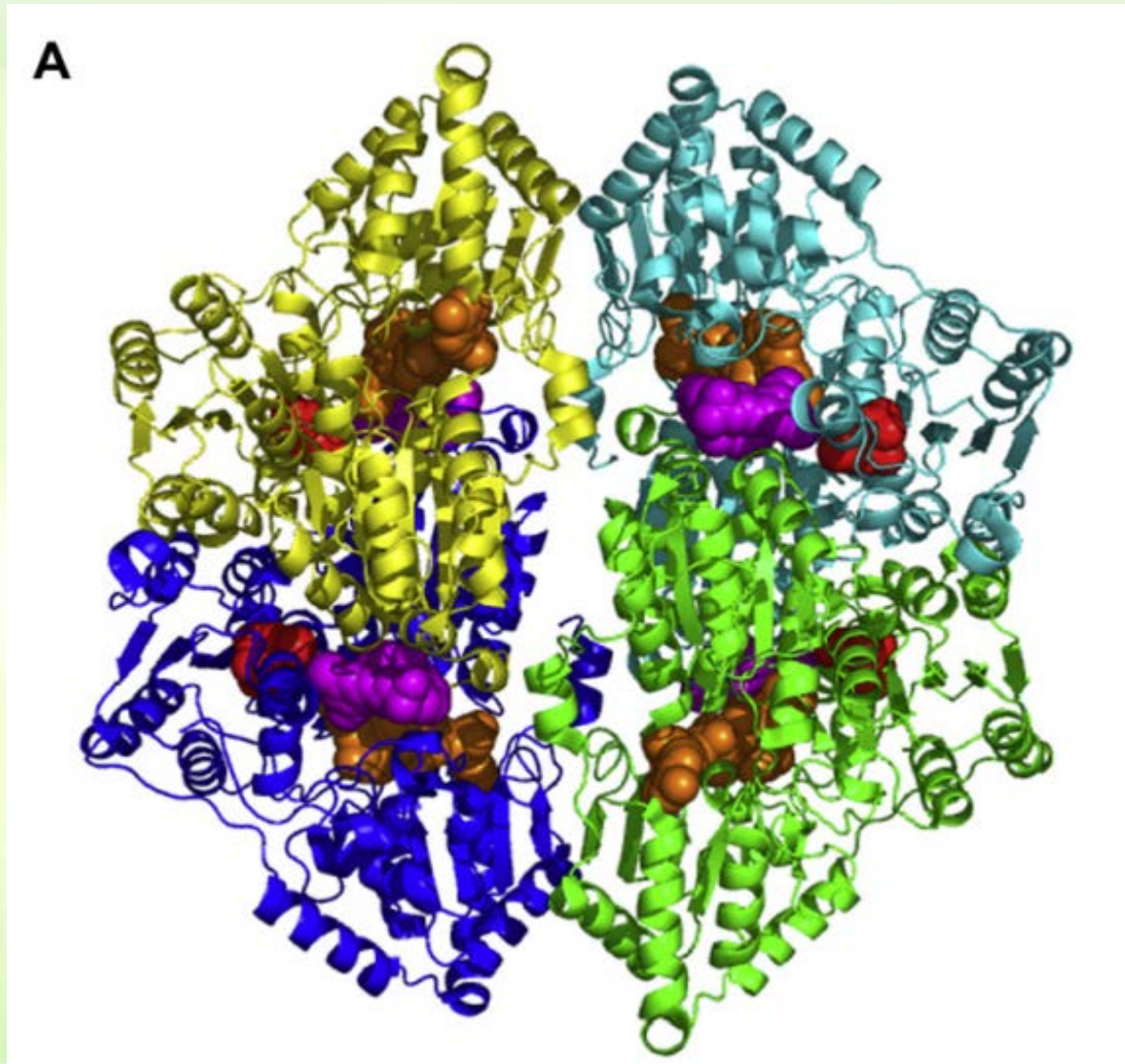


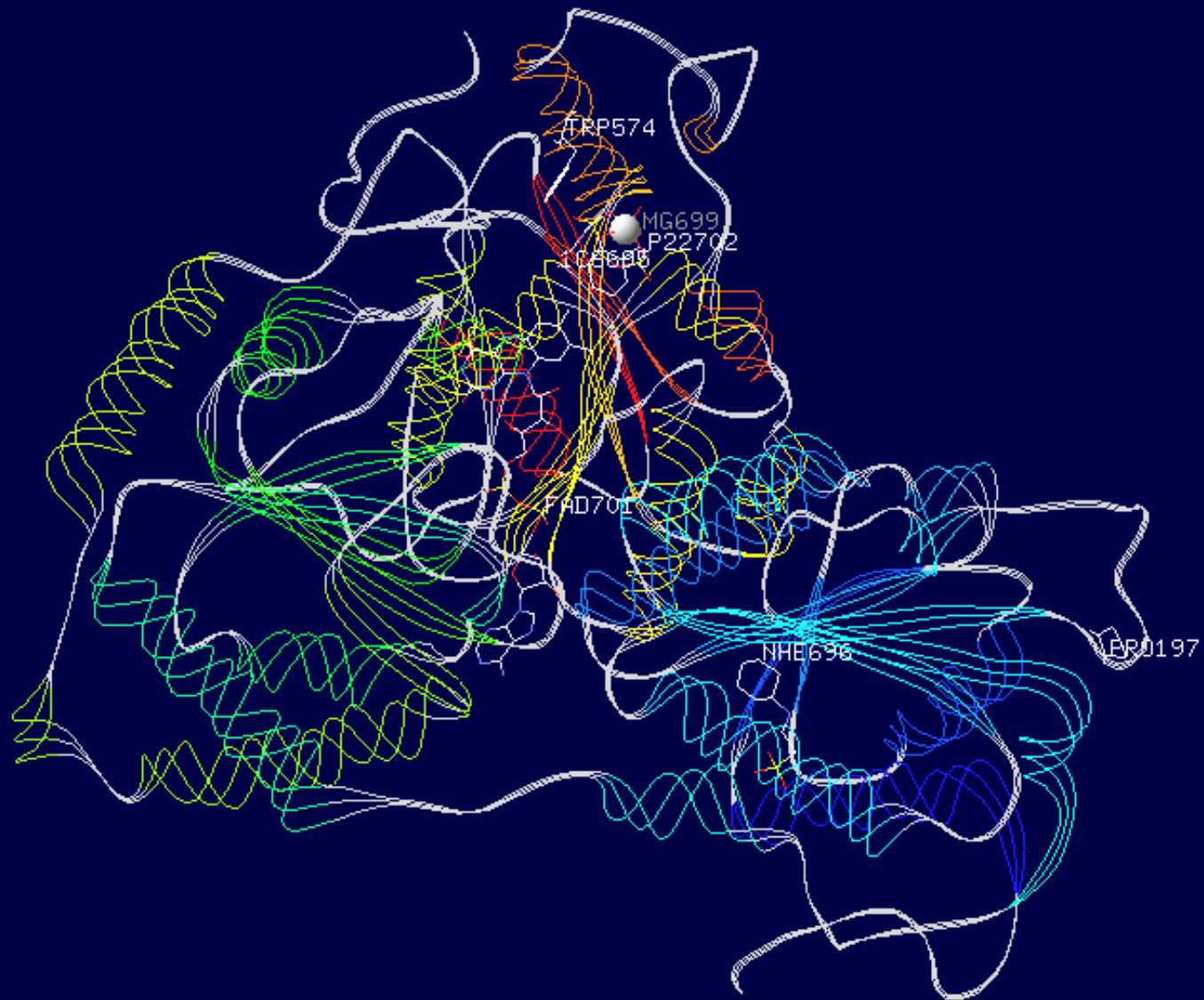
图 1-6 拟南芥 ALS 的 5 个保守区及 6 个突变位点

A122、P197、A205、D376、W574、S653

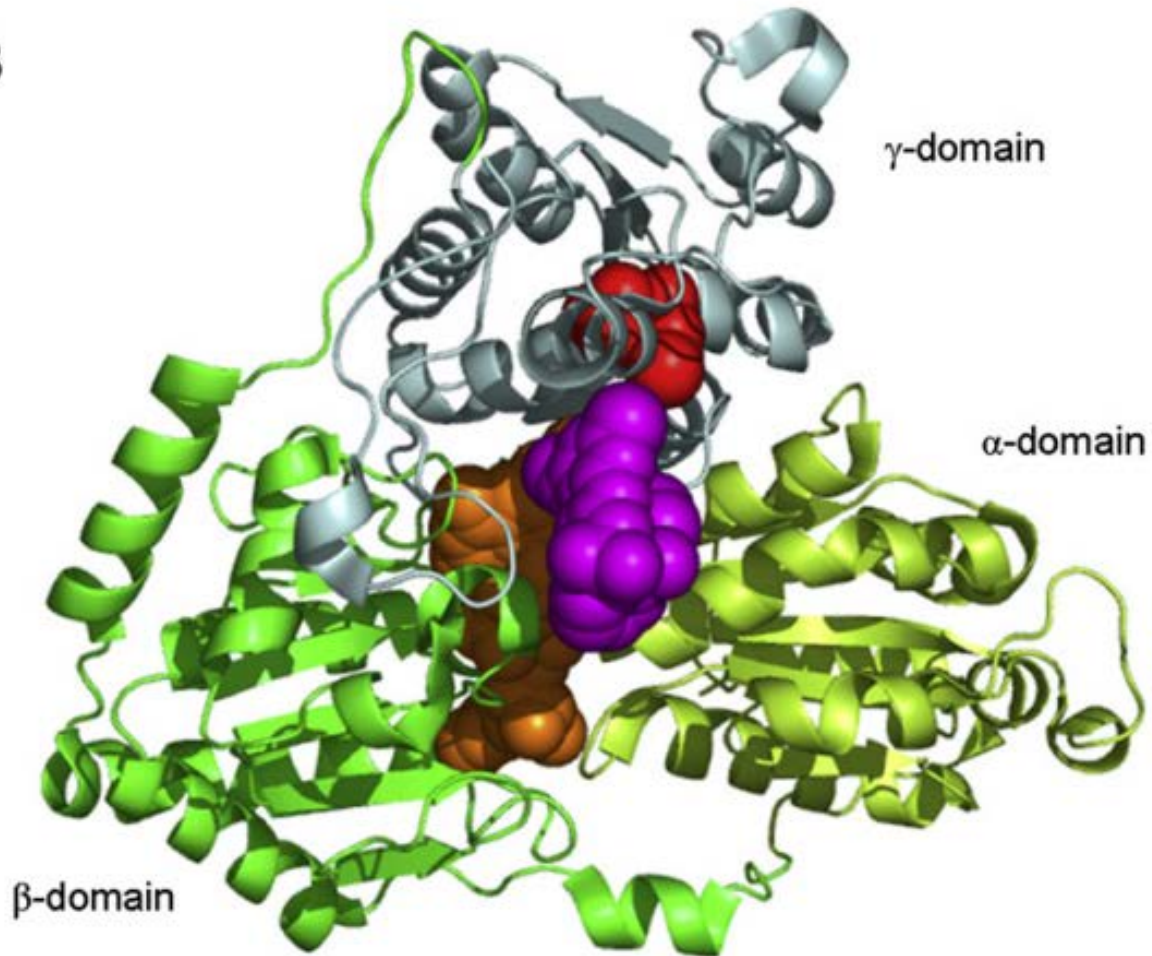
Devine et al

拟南芥ALS四聚体结构



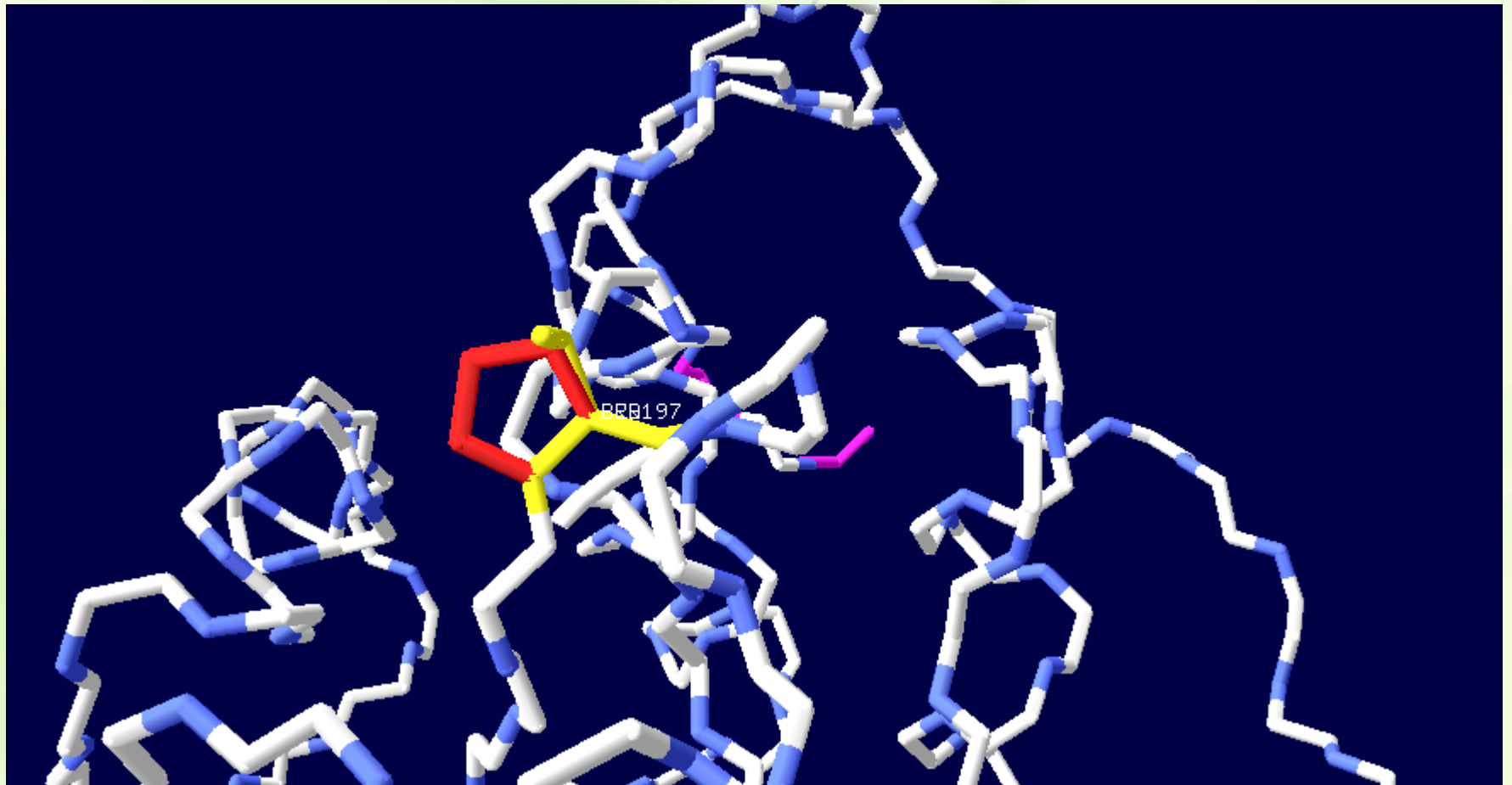


B

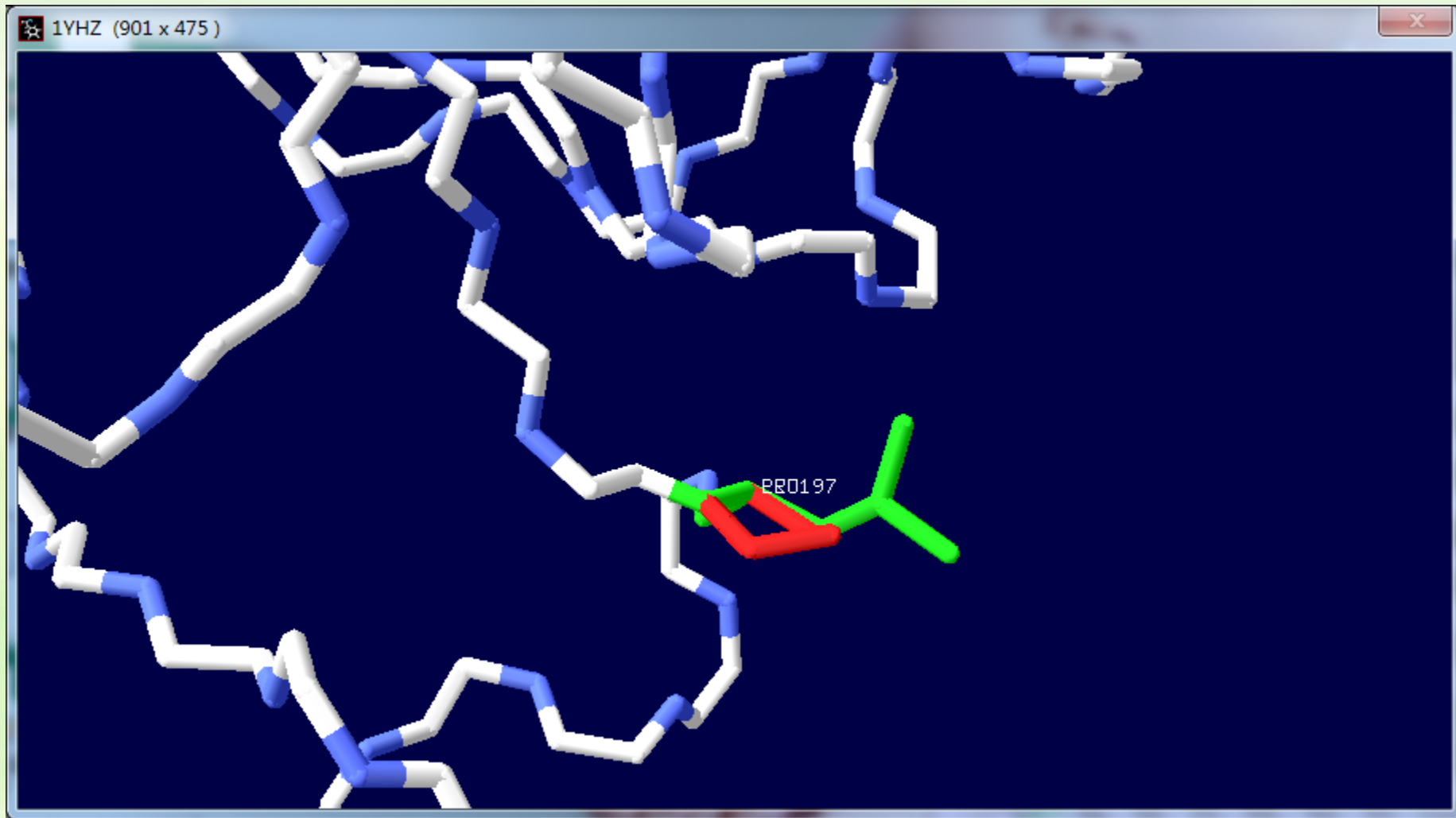


Ronald, et al

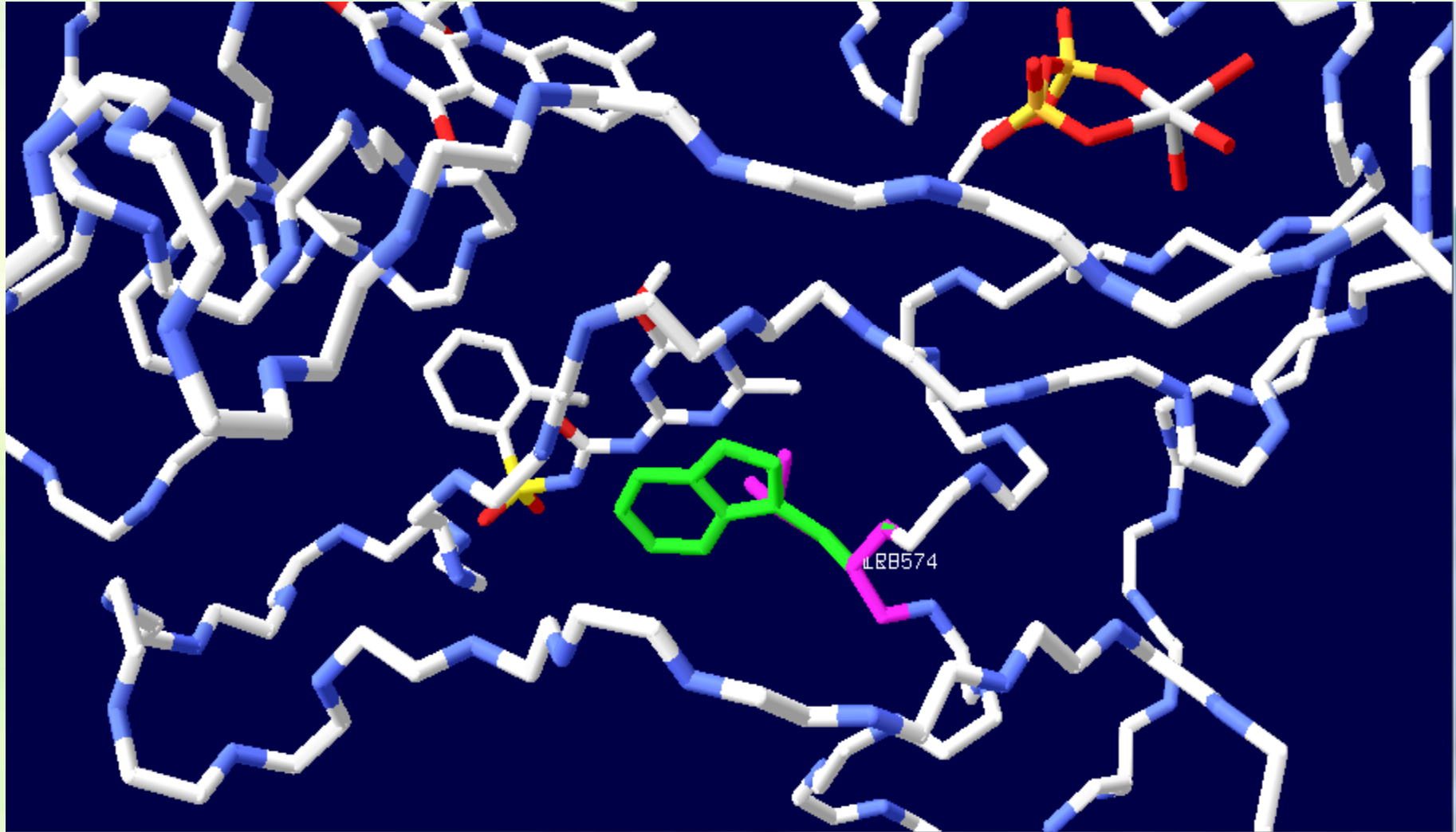
Pro197 (红色) 突变为Ser197 (黄色)



Pro197 (红色) 突变为Leu197 (绿色)



Trp574 (绿色) 突变为Ile574 (粉色)



- Pro197位于 ALS 活性位点通道入口 α 螺旋的一端,尽管 Pro197残基结合 SU 类除草剂的芳香环,但是它并不直接与 IMI 类除草剂咪唑喹啉酸发生作用,咪唑喹啉酸仅结合在 ALS 活性位点通道的中间位置。由于这个原因,Pro197只有被大的氨基酸残基取代才能阻碍 IMI 类除草剂的进入而 Pro197被其他任一八种氨基酸取代都能阻止 SU 类除草剂的进入。
- Trp574位点的突变能够使杂草对 SU 类和 IMI 类除草剂均产生抗药性,不仅因为 Trp574残基决定着 ALS 活性位点通道的形状,而且还在 SU 类和 IMI 类除草剂与酶的结合中起着重要作用。

(四) 研究计划

- 设计引物，扩增得到苘草的ALS基因
- 寻找苠草ALS的保守区及突变位点
- 分离、纯化苠草ALS，测定酶活
- 测定苠草对ALS抑制剂的抗性水平，分析其抗性机制

参考文献

- 宋晓丰,叶桂峰. 苘草的生物学生态学特性及防除研究进展[J]. 杂草科学, 2010(1) : 1- 3.
- 郑培忠,沈健英.新型乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂作用机理的研究进展. 杂草科学.2009,3:1-6
- 崔海兰.播娘蒿 (*Descurainia sophia*) 对苯磺隆的抗药性研究[D].中国农业科学院,2009.
- Ronald G,Duggleby,JenniferA.McCourt, Luke W. Guddat.Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*.2008,3(46) 309-324.
- Malcolm D,Devine, Amit Shukla.Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection* 19 (2000) 881-889.

致谢

- 感谢罗老师在实用生物信息技术课程上对我们的谆谆教诲，学习不是死记硬背，而是举一反三。
- 感谢实用生物信息技术2班的所有同学，互帮互助促进了我们的深入学习。
- 感谢小组的王宁、华慧芳、李可同学，讨论让我们了解更多，进步更大。
- 感谢杂草科学，教会我像杂草一样生存。
- 感谢今天这个舞台给我前所未有的经历与收获。

A close-up photograph of a ladybug with orange elytra and black spots, resting on a green leaf. The background is a soft-focus green field.

THANK YOU!