

Inhibitory biosyntézy aminokyselin

HERBICIDE MODE OF ACTIONS AND SYMPTOMS OF PLANT INJURY BY HERBICIDES:
INHIBITORS OF AMINO ACID BIOSYNTHESIS

Miroslav Jursík, Josef Soukup, Josef Holec, Veronika Venclová
Česká zemědělská univerzita v Praze

Biosyntéza aminokyselin zaujímá v metabolismu rostlin významné místo, neboť je úzce spjata s dalšími metabolickými pochody – např. fotosyntézou, asimilací amoniaku, fotorespirací, syntézou purinových a pyrimidinových bází, alkaloidů aj. Většina biosyntetických pochodů, včetně biosyntézy aminokyselin, probíhá za světla v chloroplastech, a proto se zde nacházejí i terčové enzymy této herbicidní skupiny.

Za normálních podmínek jsou nejdůležitějším zdrojem dusíku pro rostlinu nitráty. Nitráty jsou po příjmu kořenem v cytoplasmě redukovány na nitrity a dále v chloroplastech až na amoniak (pro rostlinu ve vyšších koncentracích toxický), který je zabudováván do kyseliny glutamové, glutaminu a případně i do dalších aminokyselin transaminací oxokyselin (odvozeny z oxidace cukrů). V rostlinách se vyskytuje více než 100 aminokyselin, přičemž pouze 20 z nich je součástí bílkovin. Z hlediska herbicidního účinku jsou v pochodech biosyntézy aminokyselin nejvýznamnějšími terčovými enzymy herbicidního účinku glutamin syntetáza (GS), enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (EPSP) a acetolaktát syntáza (ALS). Druhotným následkem zablokování těchto enzymů je inhibice syntézy mnoha organických sloučenin buněčného dělení v meristematických pletivech, následně pak omezení transportu asimilátů vodivými pletivy (floémem) a zastavení růstu.

Inhibitory glutamin syntetázy (GS)

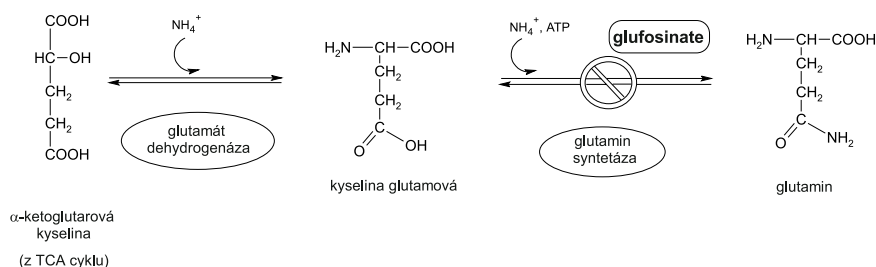
Herbicide z této skupiny působí tak, že blokují glutamin syntetázu (GS), klíčový enzym metabolismu dusíku (obr. 1.). GS je oblastí styku metabolismu uhlíku a dusíku a podílí se také na glykolátovém metabolismu fotorespirace. Tento důležitý enzym je lokalizován v chloroplastech (v nezelených částech rostlin v menší míře volně v cytoplasmě), peroxizomech a mitochondriích (glykolátový cyklus). Zabudování amoniaku do aminokyseliny probíhá dvěma způsoby. Při vyšších koncentracích NH_4^+

je funkční glutamát dehydrogenáza, která katalyzuje reakci NH_4^+ s kyselinou α -ketoglutarovou, čímž vzniká kyselina glutamová. Účinnějším je však systém GS/GOGAT (glutaminoxoglutarát amido transferáza). Narušením této reakce dochází v buňce k hromadění amoniaku. Ten je pro rostliny toxický a pokud není zabudován do organických sloučenin, poškozují vnitrobuněčné membrány, zejména tylakoidní, což vede k inhibici fotosyntézy a rozpadu chloroplastů. Přeměna kyseliny α -ketoglutarové na kyselinu glutamovou je také součástí glykolátového metabolismu fotorespirace. Výrazné narušení rovnováhy tohoto metabolismu způsobuje zastavení fotosyntézy (tento cyklus je u C3-rostlin velmi aktivní, tok dusíku je zde až 10× větší než při syntéze glutaminu). GS je centrální a nejdůležitější enzym při zabudování amoniaku do aminokyselin a z tohoto důvodu mají herbicide z této skupiny vysokou biologickou účinnost (1).

Z této skupiny herbicidů se široce používá pouze účinná látka *glufosinate* (synonymum *fosfinitricin*), který je formulován jako amonná sůl – *glufosinate-NH₄* (herbicide Basta, Liberty). Jde o neselektivní postemergentní herbicide, resp. desikanty, přijímané pouze zelenými částmi rostlin. V rostlině jsou tyto herbicide špatně translokovány na delší vzdálenosti (nejsou rozváděny cévními svazky), vykazují však lokálně systemické působení, takže účinnost bývá vysoká i ve vyšších růstových fázích plevelů, přesto je nutné dokonalé zasažení co největší listové plochy plevelů. V přírodě je *glufosinate-NH₄* produkován půdními bakteriemi *Streptomyces viridochromogenes* a *S. hygroscopicus*, čehož je využíváno při jeho biotechnologické výrobě. Současně tyto bakterie (aktinomycety) syntetizují enzym fosfinitricin-*N*-acetyl transferázu, který acetyluje volnou NH_2 skupinu *glufosinate* a tím jej deaktivuje. Geneticky upravené plodiny (řepka a kukuřice) s genem rezistence vůči *glufosinate* (Liberty Link technologie) obsahují tento enzym, který do nich je biotechnologicky vpravován právě z výše uvedených aktinomycet.

Po aplikaci *glufosinate-NH₄* dochází během několika hodin k poklesu fotosyntetické aktivity. Během 3–5 dnů rostliny nejprve zežloutnou a následně do 1–2 týdnů nekrotizují (obr. 2.). Vyšší a rychlejší účinnosti bývá dosahováno při vyšší intenzitě slunečního záření, vysoké vzdušné a půdní vlhkosti a vysoké teplotě (zvýšená akumulace toxického amoniaku). Pozdní podzimní ošetření (Liberty Link řepka) proto obvykle nebývá dostatečně účinné na celé spektrum plevelů (krátký den a často nízká oblačnost nebo mlhy).

Obr. 1. Schématické znázornění místa působení účinné látky *glufosinate-NH₄* (Basta) v rostlinném metabolismu



Glufosinate-NH₄ vykazuje velmi malou toxicitu pro savce a současně poměrně málo zatěžuje životní prostředí, neboť je velmi rychle odbouráván půdními mikroorganismy. Poločas rozkladu v půdě je obvykle do 1 týdne (2).

Inhibitory 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSP inhibitory)

Aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin a tryptofan) a další různorodé sloučeniny fenylpropanoidového metabolismu (flavenoidy, ligniny, auxiny, antokyaniny, alkaloidy a kumariny) vznikají tzv. šikimátovou cestou (předpokládá se, že asi 20 % veškerého fixovaného uhlíku zelených rostlin jde přes šikimátový cyklus). Zelené rostliny syntetizují tyto aromatické aminokyseliny v chloroplastech za přítomnosti enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSP). Na rozdíl od ostatních enzymů, které transformují fosfoenolpyruvát (PEP), reaguje EPSP nejdříve s kosubstrátem šikimát-3-fosfátem (S-3-P) a teprve poté s PEP jako substrátem. EPSP inhibitory tedy inhibují kondenzaci PEP s S-3-P. Při vazbě těchto herbicidů na EPSP vzniká v jednom směru reakce kompetitivní vazba na PEP a v opačném směru reakce kompetitivní vazba na S-3-P. Inhibice EPSP je primárním místem působení těchto herbicidů (obr. 3.). Sekundárně tyto herbicidy působí také na porfyrinový cyklus, ve kterém se syntetizují například chlorofyly, cytochromy, peroxidázy atd. a na přeměnu sukcinil KoA na kyselinu aminolevulinovou, tím že omezují aktivitu aminolevulinát syntázy a významně zasahují také do metabolismu auxinů. Rostliny však obvykle hynou dříve než dochází k projevům sekundárního působení (1).

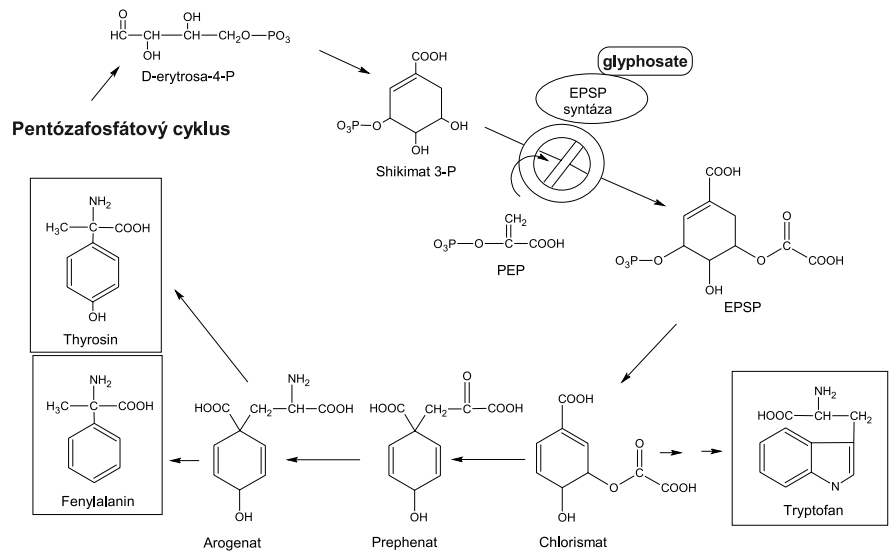
EPSP inhibitory jsou snadno disociovatelné soli *glyphosate*: isopropylamin (*glyphosate-IPA*) a trimesium (*sulphosate*). Herbicidně aktivní je však pouze *glyphosate* anion (obr. 4.). Vzhledem k rychlému rozkladu v půdě je *glyphosate* přijímán pouze listy. Rostlinou je poměrně dobře a rychle translokován floémem do všech nadzemních i podzemních zásobních orgánů (vysoká účinnost na vytrvalé plevele, především pýr plazivý). Nejvyšší translokaci *glyphosate* vykazuje, jsou-li plevele v období intenzivního růstu. Oblast jeho použití je velmi široká:

- jako neselektivní herbicid na orné půdě aplikovaný v meziorostním období,
- ošetření nezemědělské půdy (cesty, železnice, sportoviště, atd.),
- podkmenná ošetření sadů a vinic,
- předsklizňové ošetření obilnin (desikační a herbicidní funkce),
- selektivní herbicid v GM plodinách (kukuřice, cukrová řepa, sója, atd.) s tolerancí ke *glyphosate* (např. Roundup Ready technologie).

Obr. 2. Poškození cukrovky způsobené účinnou látkou *glufosinate-NH₄* (Basta); pokud je cukrovka zasažena ve vyšších růstových fázích, obvykle dokáže regenerovat (kontaktní působení)

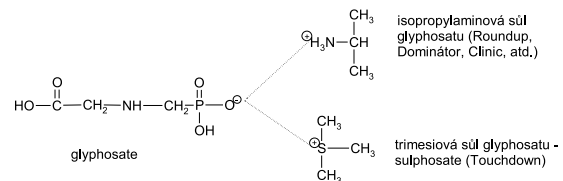


Obr. 3. Schématické znázornění místa primárního působení EPSP inhibitorů (*glyphosate*)

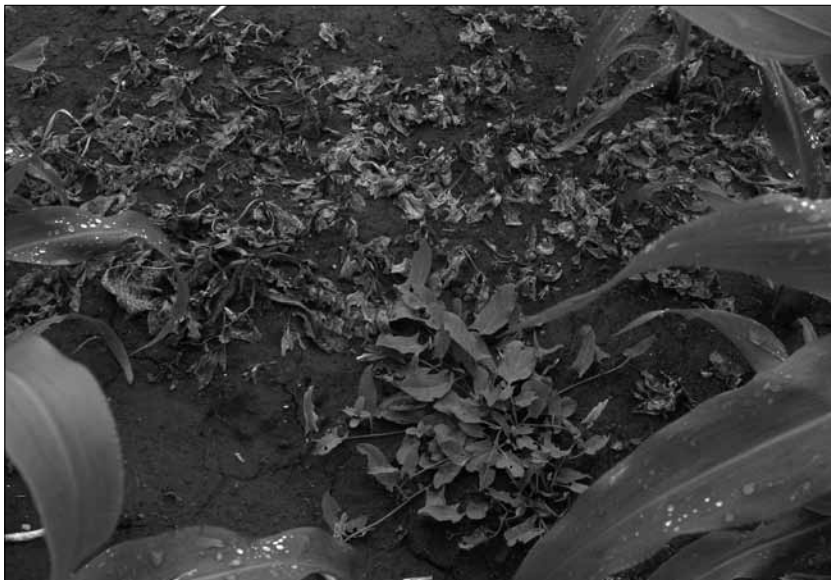


Přestože herbicidy obsahující úč. látku *glyphosate* (Roundup, Dominator, TouchDown, Glyphos, atd.) pokrývají velmi široké spektrum plevelů, existují významné rozdíly v citlivosti jednotlivých plevelných druhů. Laskavce, pětoury, penízek

Obr. 4. *Glyphosate* může být formulován jako isopropylaminová sůl (*IPA*), nebo jako trimesiová sůl (*sulphosate*)



Obr. 5. Svlačec rolní je ke glyphosatu velmi odolný: Roundup Ready kukuřice ošetřená herbicidem Roundup v dávce 4 l.ha⁻¹



Obr. 6. Vadnutí a chlorózy listů slunečnice, 10 dní po aplikaci glyphosatového herbicidu (TouchDown)



rolní, atd. jsou velmi citlivé a jsou proto potlačovány již v nízkých dávkách herbicidu (často nižší než 1 l.ha⁻¹). Pcháč rolní, kakosty, violky, atd., a ve vyšších růstových fázích také ježatka kuří noha a merlíky, však nemusí být dokonale potlačeny ani dávkou herbicidu 3 l.ha⁻¹.

Velmi odolný je svlačec rolní (obr. 5.) a např. přeslička je tolerantní zcela. Nízké dávky glyphosatových herbicidů jsou často používány k potlačení pýru v jetelovinách, především vojtěšce (jde však pouze o sníženou citlivost jetelovin, nikoliv o naprostou toleranci). GM technologie využívají tři typy transgenů podmiňující rezistenci ke *glyphosatu*:

- **výrazná nadprodukce EPSP**: cílem je, aby v buňce plodiny byla vysoká koncentrace EPSP i za předpokladu, že bude veškerý *glyphosat* již vázán na EPSP a stále zůstával volný EPSP, který vykáže dostatečnou katalytickou aktivitu (3),

- **modifikace EPSP**: cílem je aby EPSP plodiny nebyla ke *glyphosatu* citlivá – odlišná primární struktura EPSP (4),

- **produkce glyphosat oxidoreduktázy**: cílem je produkce enzymu který *glyphosate* velmi rychle degraduje.

Příznaky poškození *glyphosatem* se projevují celkem pomalu. Pomalejší působení je vysvětlováno určitými rezervami aminokyselin v cytoplazmě buněk. Zasažené rostliny sice téměř okamžitě zastavují svůj růst, nicméně až po několika dnech se začnou objevovat chlorózy (nejprve vegetační vrchol) a vadnutí – ztráta turgoru (obr. 6.). Do 1–3 týdnů (v závislosti na druhu a povětrnostních podmínkách) rostlinná pletiva nekrotizují a následně odumírají. U některých druhů se může objevit antokyannové zabarvení listů. Subletální dávky těchto herbicidů se projevují podobně jako poškození fenoxykyselinami – kroucení listů, obrůstání. Při aplikaci je třeba dávat pozor na úlet, neboť zasažené sousední citlivé plodiny mohou být silně poškozeny (obr. 7.).

Glyphosate má příznivé ekotoxikologické vlastnosti (EPSP je specifický rostlinný enzym, kterým jiné organismy nedisponují). Má velmi nízkou toxicitu pro savce (LD₅₀ pro člověka je 5 000 mg.kg⁻¹). V půdě je silně disociován a poután koloidy a rychle rozkládán půdními mikroorganismy. Problémy s perzistencí a proplavováním v půdě však byly zaznamenány na boreálních půdách s nedostatečnou mikrobiální aktivitou a nízkým obsahem fosforu (5).

Využití HT hybridů s genem rezistence k účinné látce *glyphosate* a *gluphosinate* v cukrovce

Regulace plevelů v konvenčních porostech cukrovky je poměrně nákladná (náklady na herbicidy tvoří až 15 % tržeb z produkce řepy), většina plevelů je herbicidy úspěšně potlačována pouze v raných růstových fázích. K zasažení širšího spektra plevelů je třeba používat kombinace několika účinných látek

v několika termínech. Za nepříznivých povětrnostních podmínek (vysoké teploty a intenzita slunečního záření) způsobují tyto herbicidy poškození cukrovky (6, 7). Zavedení technologií využívajících HT hybridů s genem rezistence k účinné látce *glyphosate* a *gluphosinate* by proto mohlo znamenat výrazné zjednodušení regulace plevelů v této plodině, kdy především volba termínů herbicidního ošetření je velmi flexibilní (účinnost těchto herbicidů není zásadním způsobem ovlivněna růstovou fází plevelů). Nezanedbatelnou výhodou je možnost regulace plevelné řepy (8) a výrazná selektivita k plodině, takže riziko fytoxicity je minimální (9). V neposlední řadě je výhodné také porovnání nákladů na ochranu proti plevelům, a to zejména pokud se na pozemku vyskytují problematické plevele (pýr plazivý, pcháč rolní, svlačec rolní, výdrol brambor, mračňák theophrastův, atd.), které konvenční regulaci plevelů prodražují.

Bohužel v EU se zatím nepředpokládá povolení těchto technologií v cukrovce, přestože např. v USA je takto pěstováno přes 95 % ploch.

Inhibitory acetolaktát syntázy

Inhibitory acetolaktát syntázy jsou nejpočetnější a nejpoužívanější skupinou herbicidů. Podrobněji proto bude tato skupina herbicidů, která rovněž inhibuje biosyntézu aminokyselin, probrána samostatně v příštím díle.

Tato práce vznikla za podpory projektu MSM 6046070901 a NAZV QH71254.

Souhrn

Z hlediska herbicidního účinku jsou v pochodech biosyntézy aminokyselin nejvýznamnějšími terčovými enzymy herbicidního účinku glutamin syntetáza (GS), enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (EPSP) a acetolaktát syntáza (ALS). Z herbicidů inhibující GS se široce používá pouze úč. látka *glufosinate*. Jde o neselektivní postemergentní herbicid, resp. desikant, který je přijímán pouze zelenými částmi rostlin. V rostlině je špatně translokován na delší vzdálenosti, vykazuje však lokálně systemické působení, takže účinnost bývá vysoká i ve vyšších růstových fázích plevelů. Vyšší a rychlejší účinnosti bývá dosahováno při vyšší intenzitě slunečního záření, vysoké vzdušné a půdní vlhkosti a vysoké teplotě. EPSP inhibitory jsou snadno disociovatelné soli úč. látky *glyphosate*. Vzhledem k rychlému rozkladu v půdě je *glyphosat* přijímán pouze listy. Rostlinou je poměrně dobře a rychle translokován. Nejvyšší translokaci vykazuje *glyphosate*, jsou-li plevelé ošetřeny v období intenzivního růstu. Zasažené rostliny sice téměř okamžitě po aplikaci zastavují růst, nicméně až po několika dnech se začnou objevovat chlorózy a vadnutí. Do 1–3 týdnů po aplikaci pletiva nekrotizují a následně odumírají. U některých druhů se může objevit antokyanové zabarvení listů.

Klíčová slova: mechanismus působení herbicidů, místo působení herbicidů, glufosinate NH₄, glyphosate, cukrovka, fytoxicita.

Literatura

- DEVINE M. D., DUKE S. O., FEDTKE C.: *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall, New Jersey, 1993.
- SHIMES K. ET AL.: Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. *Agricultural Water Management*, 84, 2006 (1–2), s. 53–64.
- HORSCH R. H. ET AL.: Agrobacterium-mediated gene transfer to plants: engineering tolerance to glyphosate. *Iowa State Journal of Science*, 62, 1988, s. 487–502.
- COMAI L., SEN C. L., STALKER M.: An alternative *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*, 221, 1983, s. 369–371.
- LAITINEN P. ET AL.: Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant and Soil*, 323, 2009 (Special Issue 1–2), s. 267–283.
- TENNING P.: Transgenic herbicide tolerant sugar beet—present status and future developments. *Aspects Appl. Biology*, 52, 1998, s. 273–278.
- JURSÍK M., SOUKUP J., HOLEC J.: Regulace plevelů v cukrovce. *Listy cukrov. řepař.*, 124, 2008 (7/8), s. 207–210.
- BRANTS I., HARMS H.: Herbicide tolerant sugar beet. In *61st IIRB Congress*, 1998, s. 195–204.

Obr. 7. Poškození kukuřice způsobené úletem glyphosatového herbicidu



- BUTNER G., BEIBNER L., HARMS H.: Tolerance to selective and non selective herbicides in conventional and genetically modified sugar beet. In *61st IIRB Congress*, 1998, s. 333–337.

Jursík M., Soukup J., Holec J., Venclová V.: Herbicide mode of actions and symptoms of plant injury by herbicides: Inhibitors of amino acid biosynthesis

From the point of view of herbicide efficacy, the most important target enzymes in amino acid biosynthesis processes are glutamine synthetase (GS), enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP), and acetolactate synthase (ALS). Among GS inhibiting herbicides, active ingredient *glufosinate* is widely used. It is a non-selective post-emergent herbicide or desiccant which is uptaken by plants by green parts only. This active ingredient is poorly translocated to longer distances in plant body but it shows locally systemic activity so its efficacy is high also in the case of later growth stages of weeds. Higher and faster efficacy can be reached under conditions of higher intensity of sunlight, high air and soil moisture and high temperature. EPSP inhibitors are easily dissociated salts of *glyphosate*. In relation to its rapid decomposition in the soil, *glyphosate* is uptaken by leaves only. It is relatively well and rapidly translocated by the plant. *Glyphosate* shows the highest translocation rate when weeds are treated during the period of intensive growth. Even if the affected plants stop their growth immediately after application, chlorosis and wilting occur after several days. Plant tissues necrotise and subsequently die after 1–3 weeks. Some species can show anthocyanin coloration of the leaves.

Key words: herbicide mode of action, herbicide site of action, glufosinate NH₄, glyphosate, sugar beet, phytotoxicity.

Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Miroslav Jursík, Ph. D., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchbát, Česká republika, e-mail: jursik@af.czu.cz