

HPPD 抑制剂的机理与应用进展

赵李霞, 叶非*

(东北农业大学理学院, 哈尔滨 150030)

摘要 HPPD是在植物光合作用过程中发现的一类新型除草剂靶标酶,可以催化对羟基苯基丙酮酸氧化脱羧转变为尿黑酸。HPPD抑制剂的抑制作用会导致植物分生组织产生白化症状,最终死亡。本文对HPPD的作用机理以及HPPD抑制剂主要品种的应用作了综述。

关键词 HPPD; 除草剂; 抑制剂

中图分类号 S 482.4

Mechanisms and applications of some HPPD-inhibiting herbicides

Zhao Lixia, Ye Fei

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract HPPD is a new type of target herbicidal enzyme found in the process of photosynthesis, which catalyzed HPP transformed into homogentisate. HPPD-inhibiting herbicides can lead to plant whitening and final death. This paper reviewed the action mechanisms of HPPD and the applications of some HPPD-inhibiting herbicides.

Key words HPPD; Herbicide; Inhibitor

对羟基苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)是20世纪90年代确定的除草剂作用靶标酶。该酶抑制剂具有广谱的除草活性,能同时防除阔叶作物中的阔叶杂草,可以在芽前使用,也可以在苗后使用,具有活性高、残留低、环境相容性好、使用安全的特点。以HPPD作为靶标已开发出若干不同结构类型的高活性除草剂,包括吡唑类、三酮类、异噁唑类、二酮腈类和二苯酮类化合物。这些除草剂在分子结构上具有如下特点:(1)含有一个三羰基甲烷结构单元,其中一个羰基必须和取代苯环直接相连。(2)化合物能够烯醇化以保证它具有与对羟基苯基丙酮酸(HPP)竞争HPPD活性中心 Fe^{2+} 进行络合的能力。目前尚未发现有关其抗性的报道,因此,这是一类有发展前景的需光型除草剂^[1]。本文对HPPD抑制剂主要品种的作用机理以及应用作了详细综述。

1 HPPD 的作用机理

自20世纪初HPPD酶被发现以来,在微生物、哺乳动物和植物中都找到了HPPD,但在不同的生

物体内作用机制不同。在哺乳动物体内,HPPD酶对于酪氨酸的分解代谢有很重要的作用;在植物体内HPPD酶催化质体醌与生育酚生物合成的起始反应^[2]。Yang C从拟南芥中提取到除草剂目标酶HPPD的晶体结构,确定了它有多个开放的扭曲混合筒形面,外面有螺旋环绕^[3]。拟南芥HPPD结构中的金属离子与His205、His287、Glu373和3个水分子配位组成一个八面体复合物,活性位点位于其中一个开放的扭曲混合筒形面,催化中心的金属离子是 Fe^{2+} 。非选择性抑制剂结合的哺乳动物(小鼠)的HPPD结构与拟南芥HPPD总体很相似,但小鼠的HPPD酶在C-端螺旋之前有一个短的刚性环,这可能直接限制了螺旋的灵活性以及可能的取向。在约1000个HPPD抑制剂中筛查发现了6个高植物选择性的抑制剂,它们在 C_3 结构上有一个苯基取代或在吡唑环的N1结构上有一个叔丁基取代;而有些结构具备了这两者的共性。对于植物和哺乳动物HPPD-配位结构的细节比较获得的特定HPPD抑制剂高植物选择性的结构认识,为设计有效的植物HPPD抑制剂提供了指导。

HPPD 酶是一种铁-酪氨酸蛋白^[4],它在各种有机体中催化植物体内质体醌与生育酚生物合成的起始反应,即催化对羟基苯基丙酮酸转化为尿黑酸的过程,同时释放出 CO_2 ^[5]。HPPD 酶的催化活性受酸度、温度、还原剂以及植物细胞溶液的影响。研究认为在催化反应的第一步(图 1),对羟基苯基丙酮酸利用其 α -酮酸部分在氧气辅助下与 HPPD 酶键合生成络合物;然后对羟基苯基丙酮酸中双氧被活化,三元的酶-底物-双氧配体首先对铁(II)-过酸中间体脱羧放出 CO_2 得到化合物 A;化合物 A 的 O-O 键异裂得到铁

(IV)-氧络合的化合物 B,化合物 B 反应活性很高,它进攻苯环产生一个由 Fe-C 键组成的四元环并发生重排成为芳烃氧化物中间体 C;随后中间体 C 打开,环氧化物环组成阳离子 σ 复合物 D;复合物 D 中的乙酰结构从苯环的 C^1 侧链迁移到 C^2 转化为酮中间体 E;最后酮中间体再次芳香化得到终产物尿黑酸。此外,还有一种机理认为,铁(IV)-氧络合的化合物 B 作为亲电基团攻击了苯环的 C^1 碳原子,然后可以直接组成阳离子 σ 复合物 D。研究发现芳香氧化物的形成和催化活性之间没有关联性^[5]。

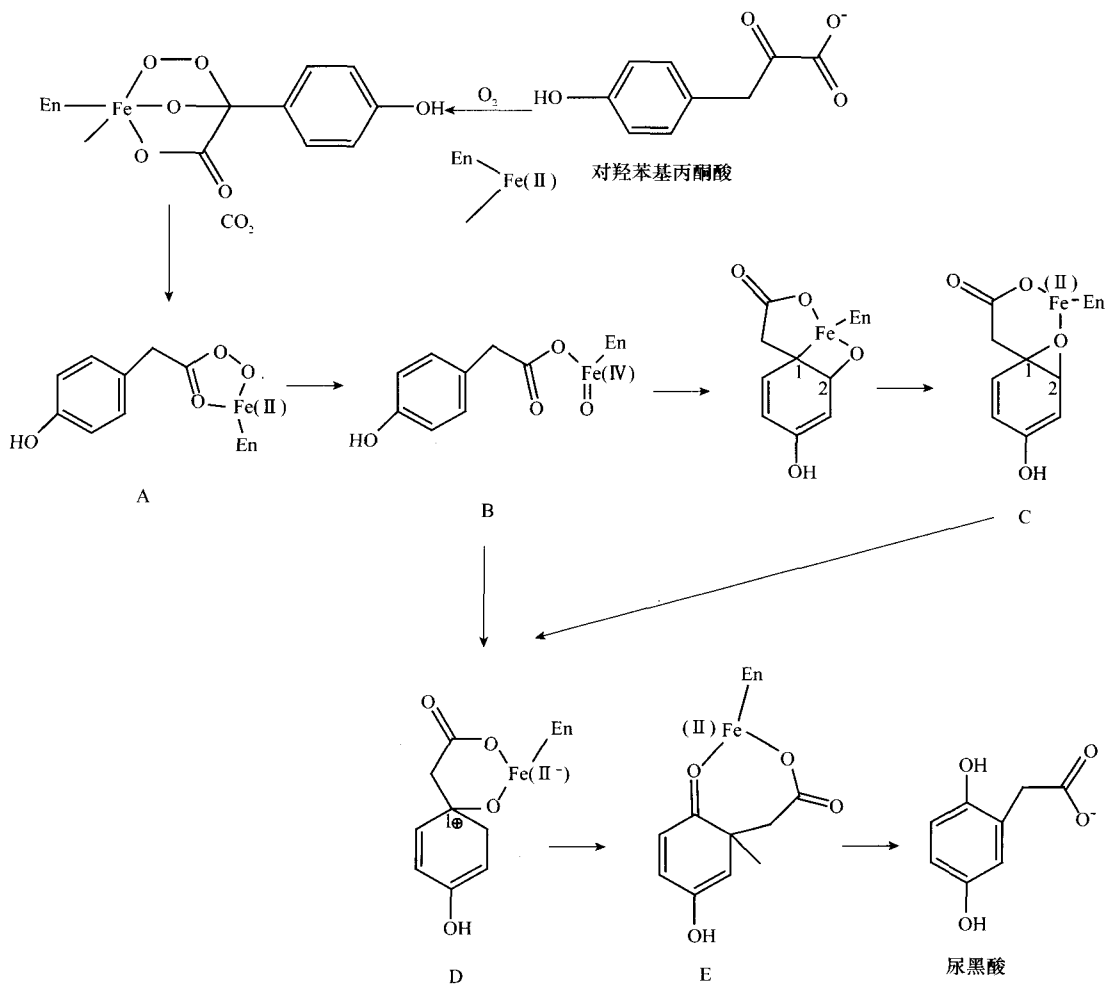


图 1 对羟基苯基丙酮酸转化为尿黑酸的过程

对羟基苯基丙酮酸在 HPPD 酶催化条件下转化得到的尿黑酸是植物体内一种重要物质。它可以进一步脱羧、聚戊二烯基化和烷基化,从而生成质体醌和生育酚^[7-8]。HPPD 酶抑制剂的抑制结果是植物体内质体醌和生育酚的减少,引起植物白化症状^[9]。为了确定改变 HPPD 活性能够影响生育酚含量,Yoseph 在转基因作物拟南芥中过量表达了

HPPD,得到的转基因作物对 HPPD 抑制剂除草剂磺草酮的抗性增加,证明该作物 HPPD 活性很高^[10]。通过核糖核酸的检测发现,转基因株系中 HPPD 的蛋白质含量和活性水平比野生植物要高 10 倍;对叶子和种子材料的生育酚含量进行分析发现:叶子中生育酚含量升高了 37%,种子中生育酚含量升高了 28%。实验的结果表明:HPPD 活性或

者尿黑酸含量能够影响光合作用和非光合作用植物细胞中生育酚的生成。FalkJ 等利用 HPPD 活性提高植物中生育酚的含量实验结果表明:得到的转基因株系种子中的生育酚含量比普通株系高两倍,而叶子中的生育酚含量没有受到影响^[11]。HPPD 活性能够影响植物细胞中生育酚的生成;同时,HPPD 抑制剂除草剂的潜力激发了人们发展高抗性转基因作物的兴趣。

2 主要的靶标 HPPD 除草剂品种及其应用

早在 1985 年人们就发现 HPPD 有可能成为除草剂新品种的新靶标。到目前为止,除了吡唑类品种外,新近又有一些广谱、高活性新品种被开发出来,包括三酮类的磺草酮(sulcotrione)、甲基磺草酮(mesotrione)和双环磺草酮(benzobicylon)以及异噁唑类的异噁唑草酮(isoxaflutole,百农思)以及后来发现的二酮腈类和二苯酮类化合物。2002 年 G. Meazza 研究了 34 种不同结构的天然产物对 HPPD 的抑制活性,结果发现拟南芥的重组细胞 HPPD 对很多种天然化合物很敏感,它们包含:三酮类,苯醌类,萘醌类和蒽醌类^[12]。这些物质不同的动力学行为提供了新型 HPPD 抑制剂结构设计的发展方向。

2.1 三酮类除草剂

三酮类除草剂是由捷利康公司开发的一类 HPPD 抑制剂,目前已有 3 个品种开发成功,它们是磺草酮、甲基磺草酮和双环磺草酮^[13]。磺草酮是商业化开发的第 1 个三酮类除草剂品种,在欧洲各国广泛使用,也是我国农药企业关注的一个品种。与传统的玉米田除草剂相比,磺草酮环境相容性好,可有效地防除多种阔叶杂草和禾本科杂草。磺草酮的开发和商品化具有深远意义及广阔开发前景^[14]。J. S. Kim 的研究表明除草剂磺草酮不同程度上降低了植物中叶绿素和类胡萝卜素含量。磺草酮的主要除草剂作用是通过减少作物中的质体醌含量来抑制成熟的绿色组织中电子的转移来达到的^[15]。研究结果表明,玉米对磺草酮的耐药性是由于玉米对药剂的吸收速度缓慢所造成;玉米体内 HPPD 的分子质量为 43 ku,其活性需有还原剂谷胱甘肽或二氯酚与抗坏血酸,当存在抗坏血酸时,玉米体内对羟苯基丙酮酸双氧化酶的活性可提高 2 倍。玉米能通过 P-450 催化的 4-羟基化作用迅速将药剂代谢为无活

性产物。15%磺草酮水剂对玉米田杂草具有较好的防除效果,表现为杀草谱较广,可有效防除马唐、牛筋草、早稗、小薊、鳢肠、铁苋菜等多种单双子叶杂草,但对马齿苋无效^[16]。15%磺草酮水剂在玉米上使用,用药时间掌握在玉米 3~4 叶期、杂草 2~5 叶期比较适宜。15%磺草酮水剂在玉米田使用比较安全,高剂量虽易造成玉米叶片边缘发白,但 5~7 d 可恢复正常。

甲基磺草酮是通过磺草酮结构修饰而开发的三酮类除草剂品种,其生物活性超过磺草酮 10 倍以上,主要用于防除玉米田杂草如苍耳等,防除对磺酰脲除草剂产生抗性的杂草有效。2000 年甲基磺草酮在欧洲登记,于 2001 年以商品名 Callisto 开始在德国与奥地利销售。由于其对环境友好,2001 年通过美国环境保护局的批准,其单剂及混合制剂于 2002 年在欧盟各国与美国销售。甲基磺草酮以其杀草谱广、活性高、可混性强、对后茬作物安全、使用灵活、环境相容性强等特点在我国具有较大开发价值及较好的推广使用前景。

双环磺草酮是由日本 SDS 生物技术公司开发的白化型水稻田用苗后除草剂^[17]。该公司于 1992 年开始合成双环磺草酮,1994 年进行田间试验,2001 年获得登记,并开发了多种混剂。该药剂的杀草谱广,能防除水田重要杂草,尤其是难以防除的具芒碎米莎草的萤蔺类效果最为明显。此外,它还具有处理时期宽和持效性长的特点,并防除对磺酰脲类除草剂的抗性杂草也十分有效。目前,双环磺草酮已经有数十个不同混剂及配方,应用范围不断扩大。在日本双环磺草酮已成为水稻田中主要应用的除草剂,2001—2003 年的使用达到 70 万 hm^2 ,约为水稻田除草剂使用面积的 24%。

三酮类除草剂的最大优点是:(1)水溶液的贮存稳定性强,不易挥发与光解;(2)与其他除草剂的相容性好,利于开发混合制剂;(3)弱酸性除草剂,便于植物吸收^[18]。D. L. Lee 研究表明三酮类除草剂的除草活性受到苯环上取代基的影响,取代基不同不仅会影响到分子的酸度还会影响到对 HPPD 酶的吸引力^[19]。

2.2 吡唑类除草剂

20 世纪 80 年代初期,日本三共、三菱油化、石原产业公司分别开发成功 3 个吡唑类 HPPD 抑制

剂除草剂:吡唑特(pyrazolate)、吡草酮(benzofenap)和苄草唑(pyrazoxyfen)。吡唑类除草剂能阻止植物体中的4-羟基苯基丙酮酸向尿黑酸的转变,从而导致无法合成质体醌和生育酚,进而间接抑制了类胡萝卜素的生物合成,使植物产生白化症状,直至最终死亡。它们具有广谱的除草活性,低残留,与环境友好,安全性好,属于苯基吡唑酮类化合物。吡唑特对稻、稗草具有选择性而对某些多年生杂草如芦苇、瓜皮草、莎草科杂草和其他水田阔叶杂草有很好的防除效果。经田间试验,吡唑特于1980年在日本注册,在稻田中使用,防除对磺酰脲类除草剂产生抗药性的慈姑、雨久花等杂草有很好的控制作用。尤其是它能与多种除草剂配合使用,并具有增效作用,能达到单独使用时所起不到的效果。在我国北方稻田中,吡唑特和丁草胺混用的综合杂草防除效果比较理想。吡草酮具内吸性,主要通过靶标杂草的根和基部吸收,最终导致死亡,具有典型的吡唑类形态上的变化,如白化、黄化等,与稗草丹和溴丁酰草胺复配可防治水稻田一年生和多年生阔叶杂草。苄草唑通过杂草的幼茎和根吸收,并传输到整个植株,具有内吸性。水稻移栽后,杂草芽前、芽后施药,可防除一年生和多年生杂草,用量为有效成分3 kg/hm²,但旱田除草效果不好。

2004年,程永浩将吡唑环代替苯环与吡唑甲酰基相连,合成了一系列结构新颖的、羰基邻位带有氨基的二吡唑酮类化合物,并测定了其除草活性^[20]。以5-氨基-1-甲基-3-取代-4-乙氧羰基吡唑为原料,与水合肼反应,生成吡唑甲酰肼后,与取代烯酮二硫缩醛环,合成了25个未见报道的新型吡唑甲酰基吡唑类化合物。用小杯法对目标化合物进行了生物活性测定,结果显示,该系列化合物有一定的除草活性。同系列化合物中,苯环上氟代化合物除草活性较高,说明电负性对活性影响很大。但是由于化合物在水和有机溶剂中的溶解度都很低的缘故,所设计的化合物活性不高。

2.3 异噁唑类除草剂

异噁唑类除草剂目前有2个品种:异噁唑草酮和异噁氯草酮(isoxachlortole)。异噁唑草酮是一种选择性内吸型芽前除草剂,主要用于玉米、甘蔗等旱作物田防除苘麻、藜、地肤、猪毛菜、龙葵、反枝苋、柳叶刺蓼、鬼针草、马齿苋、繁缕、香薷、苍耳、铁苋菜、

水棘针、酸模叶蓼、婆婆纳等多种一年生阔叶杂草,对马唐、稗草、牛筋草、千金子、大狗尾草和狗尾草等一些一年生禾本科杂草也有较好的防效,但是不能作为大豆田除草剂使用。异噁唑草酮水分散粒剂对玉米田禾本科杂草和阔叶杂草均有良好的防除效果,对阔叶杂草防除效果好于禾本科。异噁唑草酮与乙草胺混用可以降低前者的用药量,还能提高对禾本科杂草的防除效果。虽然各剂量处理区对玉米幼苗有药害,但是恢复较好,对玉米产量没有影响。玉米播后芽前土壤处理,异噁唑草酮单用时适宜的用药量为180 g/hm²,混加50%乙草胺乳油时适宜的用药量为120~150 g/hm²^[21]。在大豆田中使用时,75%异噁唑草酮水分散粒剂播后芽前土壤处理,异噁唑草酮播后苗前土壤处理,大豆能正常出苗。第1片复叶期后有降雨,初期药害症状为第1复叶变黄,并有锈色斑,心叶自叶边缘向内变黄至近白色,继而边缘干枯、脱落,形成缺刻,老叶严重黄化。新生复叶的边缘褐色,向内变黄,叶片很小,植株生长受到严重抑制。以后再出的心叶虽然绿色但极小。最终植株有50%茎叶枯死,残存植株极瘦弱,能开花结实,但荚很少,不能恢复正常生长^[22]。异噁唑草酮在国外使用也很广泛,2005年美国玉米田用异噁唑草酮的处理面积达到6%,用量共计233千吨。2007年拜耳公司将异噁唑草酮和氟噻草胺的混剂引入英国市场。异噁氯草酮于1998年开始推广应用,但使用范围不是很广。

二酮腈类结构是异噁唑类除草剂活性成分的代谢物。罗纳普朗克公司、巴斯夫公司和日本出光兴产公司分别合成了二酮腈类化合物,都表现出了很好的除草活性^[23]。图2是几个二酮腈类化合物结构。

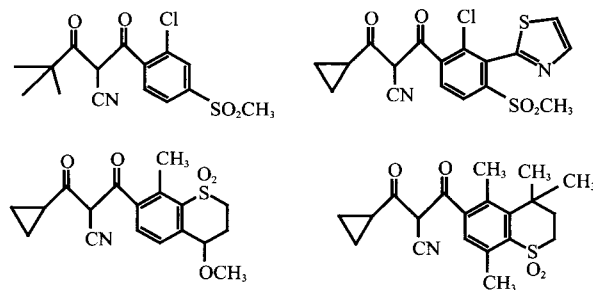


图2 二酮腈类化合物

二苯酮类化合物目前报道较少。捷利康公司和罗纳普朗克公司分别合成了二苯酮类除草剂(图

3), 它们在一定剂量下可防除多种杂草, 但是还没有推广使用^[23]。

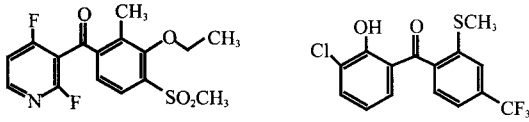


图3 二苯酮类化合物

3 展望

进入 21 世纪, 人类需要对环境友好的农药。未来除草剂的研发将严格受到环境和生态的制约, 向着多元化、高层次的方向发展。追求安全性高、生物活性高、选择性好的新型农药。这将是人类对农药产品的更高要求, 其最终目的是保护人类自身赖以生存的环境。HPPD 抑制剂除草剂是一类很有前途的除草剂。其活性高、残留低、环境相容性好、使用安全的特点符合人类对于新型除草剂的要求。未来的 HPPD 抑制剂除草剂研制将有以下发展趋势: (1) 向着高效、易降解的方向发展; (2) 基于对 HPPD 抑制剂除草剂结构与活性的研究成果, 新型除草剂问世的速度将加快、成本将降低; (3) 为了扩大杀草谱、提高安全性, 开发新的混剂和助剂将成为新的研究方向。

参考文献

- [1] 张荣升. 除草剂靶标近况和新的挑战[J]. 农药译丛, 1999, 21(1): 60-61.
- [2] 梁玉玲. 黄连对-羟苯基丙酮酸双加氧酶 HPPD 基因的 cDNA 克隆、特性分析及对烟草的遗传转化[C]// 2007 中国植物生理学会全国学术会议论文摘要汇编. 2007.
- [3] Yang C, Pflugrath J W, Camper D L. Structural basis for herbicidal inhibitor selectivity revealed by comparison of crystal structures of plant and mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases[J]. Biochemistry, 2004, 43(32): 10414-10423.
- [4] Bradle F C, Lindstedt S, Lipscomb J D, et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is an iron-tyrosinate protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(25): 11693-11696.
- [5] Crouch N P, Adlington R M, Baldwin J E, et al. A mechanistic rationalisation for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD) [J]. Tetrahedron, 1997, 53(20): 6993-7010.
- [6] Borowski T, Bassan A, Per E M, et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: A hybrid density functional study of the catalytic reaction mechanism[J]. Biochemistry, 2004, 43(38): 12331-12342.
- [7] Lee D L, Prisbylla M P, Cromartie T H, et al. The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [J]. Weed Science, 1997, 45(5): 601-609.
- [8] Pallett K E, Little J P, Sheekey M, et al. The mode of action of isoxaflutole[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 1998, 62(2): 113-124.
- [9] Yang H, Wang I, Xie Z, et al. The tyrosine degradation gene *hpdD* is transcriptionally activated by *hpdA* and repressed by *hpdR* in *Streptomyces coelicolor*, while *hpdA* is negatively autoregulated and repressed by *hpdR* [J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(4): 1064-1077.
- [10] Tsegaye Y, Shintani D K, Penna D D. Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(11): 913-920.
- [11] Matringe M, Sailland A, Pelissier B, et al. p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants[J]. Pest Management Science, 2005, 61(3): 269-276.
- [12] Meazza G, Scheffler B E, Tellez M R, et al. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase[J]. Phytochemistry, 2002, 60(3): 281-288.
- [13] 李海屏. 最近 20 年世界除草剂新品种开发进展及特点[J]. 精细与专用化学品, 2004, 5: 1-7.
- [14] 邹晓锦, 高爽, 林长福, 等. 玉米田除草剂磺草酮的生物活性及安全性[J]. 农药, 2005, 8: 382-383. [4]
- [15] Kim J S, Kim T J, Kwon O K, et al. Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues[J]. Photosynthetica, 2002, 40(4): 541-545.
- [16] 马嵘, 宋贤利, 姚志龙, 等. 15%磺草酮水剂防除玉米田杂草田间药效评价[J]. 杂草科学, 2003, 1: 34-35.
- [17] 张一宾. 除草剂双环磺草酮的研究开发[J]. 世界农药, 2006, 4: 9-14.
- [18] 聂开晟, 范志金, 刘长令. 三酮类除草剂的研究新进展[J]. 农药, 2006, 45(1): 4-7.
- [19] Lee D L, Knudsen C G, Michaely W J, et al. The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides [J]. Pesticide Science, 1998, 54(4): 377-384.
- [20] 程永浩. 1-(取代吡啶-4-甲酰基)吡啶类化合物的合成及生物活性研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 11: 2024-2027.
- [21] 王宇, 黄春艳, 陈铁保, 等. 百农思单用及混用防除玉米田杂草试验简报[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 85-86.
- [22] 黄春艳, 陈铁保, 王宇, 等. 28 种除草剂对大豆的安全性及药害研究初报[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 31-34.
- [23] 刘长令. 对羟基苯基丙酮酸酯双氧酶抑制剂的研究进展[J]. 农药, 1999, 38(2): 5-9.