

利用細胞感測器篩選具除草活性之鏈黴菌 發酵液

王耀平、陳美雅、袁秋英*

農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組。
台中。台灣

摘 要

作物栽培之雜草管理大都以施用化學除草劑為主，為維護農業生態系的永續發展及人畜安全，生物除草劑 (bioherbicides) 的開發成為漸受關注的課題。生物感測器為一種分析裝置，主要聯結生物性感應元件及訊息轉換元件所組成，具有操作簡易、快速及靈敏等特性。本研究建構轉殖大腸桿菌(*Escherichia coli*)為感測器，以阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 胱硫醚- β 分解酶 (cystathionine β -lyase, CBL)及乙酮醇酸還原異構酶 (ketol-acid reductoisomerase, KARI)為感測之標的酵素，篩選可抑制 CBL 或 KARI 酵素活性而具防除雜草潛力之鏈黴菌發酵液。阿拉伯芥 CBL 與 KARI cDNA 全長分別為 1,395 bps 與 1,776 bps，構築在 pET-28a(+) 載體後，轉形於大腸桿菌 BL21(DE3) pLysS 菌株，經 1 mM IPTG 誘導，可分別大量表現約 46 及 57 KDa 之 CBL 及 KARI 重組蛋白，再以 aminoethoxyvinyl glycine (AVG) 與 cyclopropane-1,1-dicarboxylic acid (CPD) 抑制劑建立檢量線。檢測之微生物資材為自行採集、分離及鑑定之鏈黴菌屬菌株 (*Streptomyces* sp.)，經固態培養及簡易發酵後，將發酵液添加於含阿拉伯芥 CBL 及 KARI 之重組大腸桿菌菌液中，1 小時內即可檢出鏈黴菌 S7 鏈黴菌株發酵液，具有抑制 KARI 活性之潛力。本研究建構植物特定酵素活性的快速感測平台，不僅有助於微生物代謝物作用機制的闡明，亦有利於篩選低動物毒性的生物性資材。

關鍵詞：除草活性、細胞感測器、微生物、發酵

* 通訊作者。Email: yci@tactri.gov.tw

Screening of herbicidal activity from fermentation broth of *Streptomyce* sp. using cell sensor

Yao-Ping Wang, Mei-ya Chen, Chiou-Ing Yuan

Division of Plant Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances
Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan.

Abstract

Chemical herbicides are mostly used in weed management in crop cultivation. In order to achieve the sustainable development of agro-ecosystems as well as human and animal health, biological herbicide (bioherbicides) development has become the current topic of concern. Biosensor is an analytical device which combines biological detector element and signal processors, with simple operation, rapid and sensitive characteristics. In the present work, we construct the recombinant cystathionine- β enzyme (cystathionine β -lyase, CBL) and ethyl ketone alkylated isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase, KARI) from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh in *Escherichia coli*. The whole cells are sensing system for screening microbial materials for potential bioherbicides by enzymatic inhibition assay of CBL or KARI. In addition, we have isolated and characterized the full length cDNAs of CBL and KARI with 1395 and 1776 bps, respectively. The target genes were cloned into the pET-28a(+) vector and transformed into *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain. The expression of recombinant proteins was induced by the addition of 1 mM IPTG. The CBL and KARI genes encode proteins of molecular weight 46 and 57 KDa, respectively. Here we report several isolated *Streptomyces* sp. strain, and the metabolites was produced by solid state culture and simple fermentation. The products was harvested by centrifugation then screened by this sensor system. The *Streptomyces* sp S7 was assayed within one hour, employing a calibration curve established with various concentrations of aminoethoxyvinyl glycine

(AVG) or cyclopropane-1, 1-dicarboxylic acid (CPD). In this study, we have developed a fast system detecting inhibitory activity of a specific plant enzyme. This system can not only be applied to elucidate microbial metabolites mechanisms, but also to screen biological materials of low animal toxicity.

Key words: herbicidal activity, cell sensor, microbial, fermentation

前言

作物栽培過程中，使用化學除草劑可有效避免雜草對作物的危害及干擾，具有快速、廣效、經濟且省工的特性。然而長期及大量使用化學性農藥，造成日益嚴重的抗藥性、藥劑殘留及生態環境的負面影響。生物性除草劑有別於化學除草劑，不僅資源豐富、易生物降解、毒性低、殘留低、具選擇性，大都對非目標生物和哺乳動物較安全，因此生物性除草劑的開發及其有效利用的潛力，日漸受到重視，運用微生物對寄主之專一性或天然物的代謝產物，皆具有開發為特定或廣效性防治雜草之潛力。

欲快速篩選具除草活性，且可商品化的天然資材，首先需建立簡易的生物檢測平台，一般從合成的化合物或天然資材中檢測出具有除草活性的化合物，需經過室內初篩、盆栽試驗及田間試驗等3種類型的漸進測試(Grossmann *et al.* 1992, Pestemer and Günther 1995)。目前大多數市售除草劑皆已被證實與植物體內某些特定酵素或受體結合，發生生化反應異常，而導致植物死亡。因此近年許多研究針對植物重要酵素進行高效離體測試，利用單細胞、酶、受體、細胞器或基因組，直接篩選或修飾其抑制劑，期望可開發出新活性除草劑。例如Zeneca公司利用比色分析法進行的不同離體酵素分析(Riedel *et al.* 1998)。欲快速篩選化合物對特定酵素活性的影響，亦可經由建構大量表現此酵素的轉殖微生物，成為細胞感測平台(Kao-KnifFin *et al.* 2013)。

生物感測器(biosensor)為一種分析裝置，主要聯結生物性感應元件(sensing element)及訊息轉換元件(transducing element)所組成者，可應用於農藥、重金屬及溶劑類化合物於環境之監測，亦可應用於食品安全檢驗及藥物研發(Rogers 2006)。由於生物感測器普遍具有快速、正確、靈敏及簡易等特點，因此目前成為多元化發展的新技術。其中已應用的生物感應元件類別包括核酸、酵素、抗體、微生物、植物細胞或個體；訊息轉換元件類別包括以電化學、物理或電熱等方式，將生物性訊息轉換、放大及量化分析(Lei *et al.* 2006, Malandain *et al.* 2005, Yagi *et al.*

2007)。其中，細胞感測器是由固定或未固定的活細胞與電極或其他轉換器組合而成的檢測系統。使用的細胞以原核生物為主(細菌、真菌、藻類等)(Mitchell and Gu 2004)，少部份使用真核生物(酵母菌)。現今已普遍可利用基因重組細胞感測器，構築功能性基因或啟動子，此重組微生物可特異性檢出對功能性基因具促進或抑制之效果(yuan 2009, Kao-KnifFin *et al.* 2013, Tresch 2013)。目前已建構成功或運用於毒化物分析的轉殖微生物有大腸桿菌(*Escherichia coli*)、歐洲亞硝化單胞菌(*Nitrosomonas europaea*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及集胞藻(*Synechocystis sp.*)等(Hollis *et al.* 2000, Ravanel and Douce 1996, Riedel *et al.* 1990, Shao *et al.* 2002)。亦可延伸發展為單一菌株同時感測二種以上不同的感測物質標誌，或是各別專一性檢測的多數菌株組合為檢測套組。

由於人畜安全及環保意識漸受重視，新型除草劑的開發亦著重於高效、低毒及安全等特性。欲符合此等功效，可選擇僅存在於植物及微生物中的酵素為標的，因此支鏈胺基酸生物合成途徑中的重要酵素成為研究重點，例如：胱硫醚- β 分解酶(cystathionine β -lyase, CBL)及乙酮醇酸還原異構酶(ketol acid reductoisomerase, KARI)及分別是甲硫氨酸(methionine, Met)及支鏈氨基酸生物合成途徑中的重要酵素，經由抑制此2酵素活性，中斷氨基酸合成，即可造成植物死亡(Negrutiu *et al.* 1985, Ravanel *et al.* 1996)，達到除草的目的。

本研究欲構築可大量表現阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* L.) CBL 及 KARI 蛋白質的轉殖大腸桿菌，建立細胞感測之檢測技術平台，快篩具除草活性的生物性資材。

材料與方法

一、藥品及儀器

RNeasy Plant Mini kit 及 Ni-NTA superflow (Qiagen)、SuperScript III RT-PCR kit (Invitrogen)、pGEM T-easy 載體及 DNA ligase (Promega)、大腸桿菌(*Escherichia coli*) (BL21 (DE3) pLysS) strain 及 pET-28b⁽⁺⁾載體 (Novagen)、Gel extraction kit 及 Plasmid miniprep purification kit (GeneMark)、aminoethoxyvinyl glycine (AVG)、cyclopropane-1,1-dicarboxylic acid (CPDA)、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)及 kanamycin (Sigma)、PCR thermal cycler (PTC-200, MJ)、DNA sequencer (ABI PRISM 377-96, Perkin-Elmer)、分光光度計(Biowave II, WPA)。

二、鏈黴菌發酵液之製備

2012年4月於南投埔里農地採集土壤，分離及鑑定鏈黴菌(*Streptomyces* sp.)共有46菌株，初步以PDB基礎培養基進行搖瓶之簡易發酵，約含 1×10^7 孢子之菌液，於28°C振盪培養10天，發酵液離心及過濾，儲存於-20°C備用。初步以大花咸草測試褐化反應，篩選出具除草潛力的3菌株(代號為S4, S7及S9, 資料未發表)，以此3菌株的發酵液，分別測試對轉殖大腸桿菌中表現的阿拉伯芥CBL及KARI酵素活性的影響。

三、阿拉伯芥 CBL 及 KARI 之基因選殖

依據 NCBI GenBank 中阿拉伯芥 CBL (No.NM_115564) 及 KARI (No.NM_001203198) 基因序列，設計2組引子含 *Sal* I 及 *Not* I 限制酶切位(Table 1)。萃取阿拉伯芥葉片總 RNA，以 SuperScript III RT-PCR kit，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 取約 0.5 μ g 阿拉伯芥總 RNA，合成 cDNA 之反應為 50°C 30 分鐘，94°C 2 分鐘，後續 PCR 之條件為起始變性 94°C 4 分鐘，之後以變性 94°C 30 秒，煉合 52°C 40 秒，延展 68°C 2 分鐘，循環 35 週期，最後延展 68°C 7 分鐘。取 10 μ l PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積的 bromophenol blue 染劑，注入含 1.2% (w/v) agarose 的 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 25 分鐘，取出膠體於紫外燈下觀察結果，所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較，利用內差法估計長度。PCR 增幅之核酸片段經溶洗後，進行接合反應(ligation)，取 3 μ l PCR 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector 試劑 (5 μ l 2 X Rapid Ligation buffer, 1 μ l 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 μ l T4 DNA ligase)，於 16°C 反應 14-16 小時。將單一菌落之大腸桿菌 TG1 strain，選取含有 DNA insert 之白色菌落，抽取 plasmid DNA，證轉殖之 plasmid DNA 並進行解序，利用 NCBI GenBank 的 Blast 功能比對基因庫之核酸序列。

Table 1. Primers used in this study.

Primer	DNA sequence (5' → 3')	Amplified DNA (bps)
(1) CBL-F	CGTCGACAAATGACATCTTCTCTGTCACTTCAC	1395
CBL-R	AGCGGCCGCGAGAGGGAAGGTTTTGAAGGCAA	
(2) KARI-F	CGTCGACAAATGGCGGGCTACTTCATCCATCGCT	1776
KARI-R	AGCGGCCGCTCAGTTGCTAGATTGACGCAACTC	

四、阿拉伯芥 CBL 及 KARI 融合蛋白質之誘導表現

經解序證明增幅之核酸分別為阿拉伯芥的 CBL 及 KARI 基因，將此 2 核酸以 pET28b⁽⁺⁾ 為載體，轉殖於大腸桿菌 BL21(DE3) pLysS 品系，以 1.0 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 分別誘導 CBL、KARI 及 PAL 融合蛋白質表現，於 25°C 培養 16 h，添加約 300 μ L B-PER bacterial protein extraction reagent 於菌體，萃取融合蛋白質。再以超音波破菌，經 Ni-NTA superflow 管柱純化，以 elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) 沖提，回收融合蛋白質。利用小牛血清蛋白(BSA)為標準品，以 Bradford 方法定量(Bradford 1976)。

五、S4、S7 及 S9 鏈黴菌株發酵液對阿拉伯芥 CBL 及 KARI 融合蛋白質之活性測試

(一)CBL 活性分析

參考 Droux *et al.*(1995)及 Turner *et al.*(1998)測試 CBL 活性方法略修改。添加 5 mM L-djenkolate、10 μ M pyridoxal 5'-phosphate (PLP)、50 mM Tris-HCl (pH 8.5)於 0-200 μ L 含 CBL 的大腸桿菌菌液，最後加入二次去離子水使總體積為 0.5 mL，置於 30°C 反應 30 分鐘。再加入 0.5 mL acidic ninhydrin，於 100°C 反應 10 分鐘，以分光光譜儀進行全波長掃描、記錄波長 560 nm 之吸收值，以 aminoethoxyvinyl glycine (AVG)為抑制劑建立檢量線，CBL 活性以 1 μ mole cysteine 合成量為 1U 估算 (cysteine 於波長 560 nm 約為 25,000)。

(二)KARI 活性分析

參考 Lee *et al.*(2005) 測試 KARI 活性方法略修改。添加 0.2 mM NADPH、1 mM MgCl₂、2 mM hydroxypyruvate、0-50 μ L 含 KARI 大腸桿菌菌液、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 於 0.5 μ L 含 KARI 融合蛋白質的大腸桿菌，加入二次去離子水使總體積為 1 mL，置於 30°C 反應 30 分鐘。以分光光譜儀進行全波長掃描、記錄波長 340 nm 之吸收值，以 cyclopropane-1,1-dicarboxylic acid (CPDA)為抑制劑建立檢量線。KARI 活性以 1 μ mole NADPH 減少量為 1U 估算 (NADPH 於波長 340 nm 約為 6250)。

(三) S4、S7 及 S9 鏈黴菌株發酵液抑制 CBL 及 KARI 活性之分析。

測試步驟同方法五(一)及(二)，反應前分別加入 0.3 mL S4、S7 及 S9 鏈黴菌株發酵液，以未加發酵液者為對照組，估算發酵液對 CBL 及 KARI 活性的抑制量(LU mL⁻¹)。

結果

一、阿拉伯芥CBL及KARI之基因選殖

利用RT-PCR及專一性引子，自阿拉伯芥植株葉片中分別增幅CBL及KARI基因，長度約為1,400及1,800 bps (Fig. 1)，經解序及比對序列，其開放框架序列長度分別為 1,395 及 1,776 bps，確實與 NCBI GenBank (No.NM_115564 及 No. NM_001203198)登錄者相同，即可利用 *Sal* I及*Not* I限制酶將此2核酸接合於pET 28b⁺載體，轉殖於大腸桿菌BL21(DE3) pLysS 菌株。

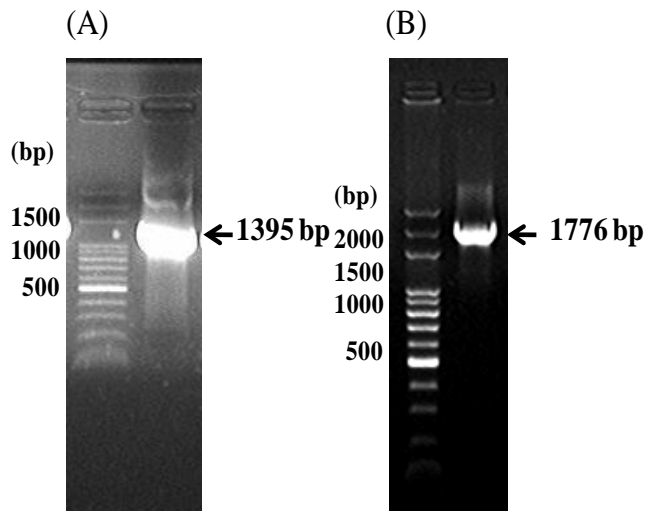


Fig.1. The CBL (A) and KARI (B) cDNA regions of *Arabidopsis thaliana* were obtained from PCR amplification by CBL-F/CBL-R and KARI-F/KARI-R primer sets.

二、阿拉伯芥CBL及KARI融合蛋白質之誘導表現

經由1.0 mM IPTG添加於含阿拉伯芥CBL及KARI外源基因的大腸桿菌菌液中，於25°C 16小時，即可誘導此2外源蛋白質的大量表現，分子量約為46及57 KDa (Fig. 2)。

三、轉殖大腸桿菌中外源之CBL及KARI酵素活性測試

分別測試0-200 μ L含CBL及0-50 μ L含KARI 大腸桿菌菌液之酵素活性，結果由cysteine合成量及NADPH減少量，顯示此2菌株可分別於波長560及340 nm的吸收值

具線性關係 (Fig. 3A)。CBL及KARI酵素分別以0-100 mM aminoethoxyvinyl glycine 及0-1.0 mM cyclopropane-1,1- dicarboxylic acid抑制劑測試，建立抑制CBL及KARI 酵素活性之檢量線，分別為

$$y = -0.0016x + 0.2288 (R^2 = 0.956) \text{ 與}$$

$$y = 0.4822x + 0.5416 (R^2 = 0.947) \text{ (Fig. 3B) 。}$$

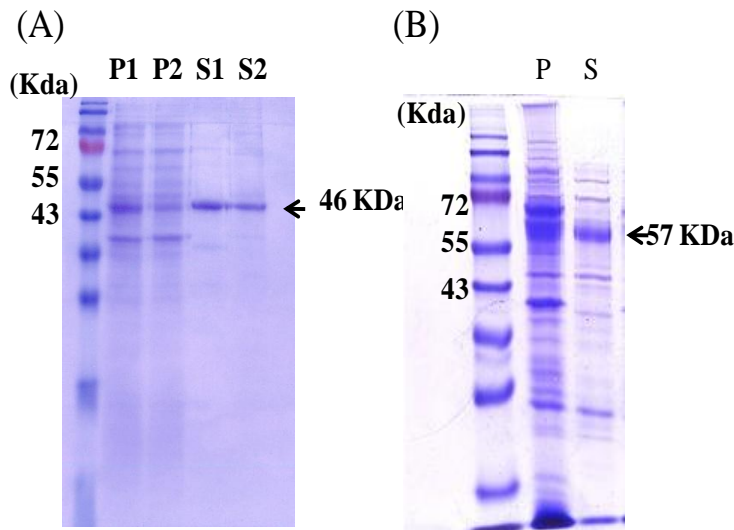


Fig. 2. Induction of CBL and KARI fusion protein of *Arabidopsis thaliana* by IPTG in pET28b⁺ transformed *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells. Transformed cell cultures were induced by IPTG to produce (A) CBL and (B) KARI fusion proteins as described in Materials and Methods. Samples (25 μ g protein) were taken after 16 h of IPTG induction and subjected to SDS-PAGE (12.5% acrylamide). Lanes P, P1 and P2 were pellets of *E. coli* total protein and CBL and/or KARI fusion protein. Lanes S, S1 and S2 were supernatants of CBL and/or KARI fusion protein. The arrowhead at right indicates the position of the IPTG-induced fusion protein of 46 and 57 kDa.

四、S4、S7及S9鏈黴菌株發酵液抑制CBL及KARI活性之分析

利用含CBL及KARI外源蛋白質的大腸桿菌，檢測鏈黴菌之發酵液，結果S4、S7及S9鏈黴菌發酵液對CBL活性的抑制量介於0.01-0.02 U μ mole⁻¹(Fig. 4A)；3菌株對KARI活性的抑制較明顯，S7菌株發酵液約有0.13 U μ mole⁻¹的抑制量，S4與S9菌株發酵液僅有0.04 U μ mole⁻¹以下的抑制效果(Fig. 4B)。

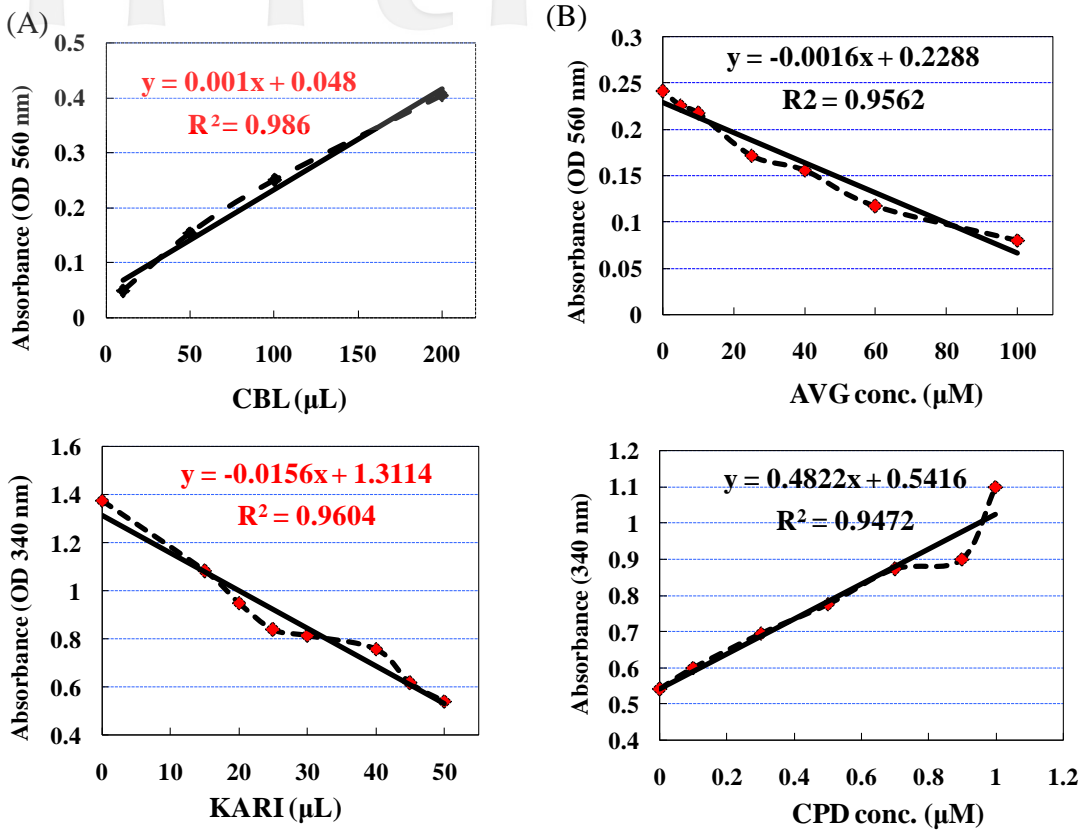
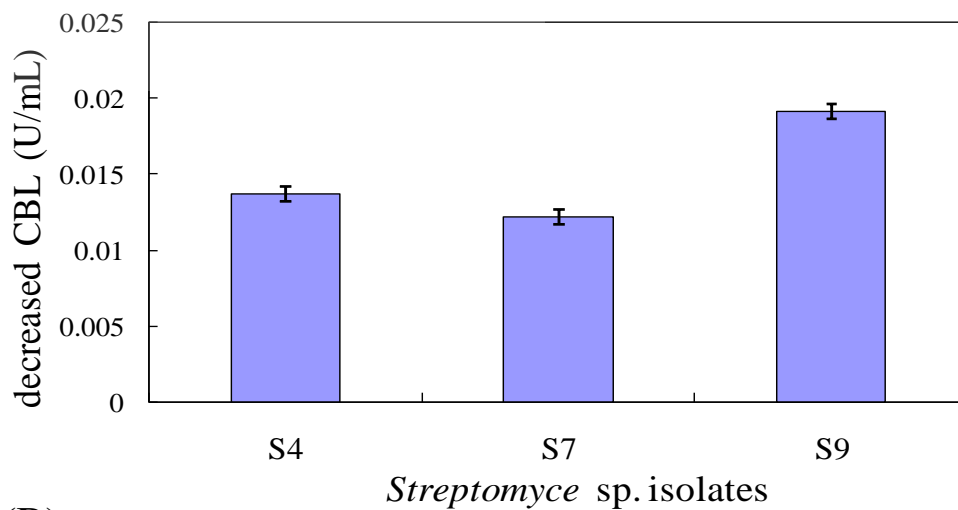


Fig. 3. Calibration curve of enzymatic activity of CBL and KARI recombinant protein from *Arabidopsis thaliana* into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS strain. (A) Relationship between the catalytic activity of CBL and KARI and the increase and/or decrease in A560 and A340, respectively. (B) Time course of enzyme inhibition. The CBL and KARI recombinant protein were preincubated with increasing amounts of AVG and CPD, respectively. The straight line was obtained by linear regression analysis of the data.

(A)



(B)

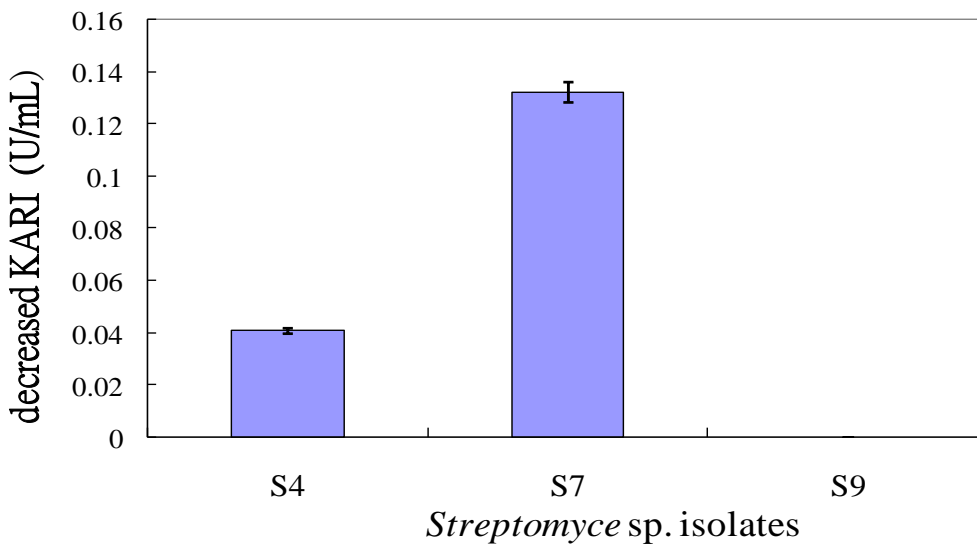


Fig. 4. Inhibition of recombinant CBL and KARI by fermentation broth of *Streptomyce* sp. S4, S7 and S9 isolates.

討 論

目前農地普遍使用的除草劑例如嘉磷塞(glyphosate)、固殺草(glufosinate)及硫醯尿素類除草劑(sulfonylureas)分別作用於 5-烯醇丙酮莽草酸-3 磷酸合成酶(5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)、(glutamine synthetase, GS)及乙醯乳酸合成酵素(acetolactate synthase, ALS),皆為胺基酸合成抑制劑,屬低毒性藥劑,然而全球近年此三類藥劑的抗藥性雜草生物型已分別有 24、2 及 133 種(Heap 2013, Schmidt 1997),目前仍急速增加中,田間的藥效亦明顯降低。然而新化學結構或新作用機制除草劑的開發日漸不易,雖然前人研究已發現有數百種以上具除草潛力的植物或微生物二次代謝物,僅極少數能發展為商品化的生物除草劑,其研發過程及實際應用間仍存在各種難處,其中以微生物代謝物發展的除草劑,常易發現新結構的化合物,或是新穎的作用機制,較活體微生物製劑,具有使用方便、易儲存及利於劑型加工等優點,後續適宜發展為藥效穩定的廣效性除草劑(Yuan and Hsieh 2012)。目前微生物代謝物中以鏈黴菌屬菌株(*Streptomyce* spp.)最有潛力,未來欲從天然物質中尋找新穎性除草資材,首先需建立快篩技術。生物活體測試最常檢測種子的萌芽率及胚軸長度,此方法對抑制光合作用的化合物較難檢出(Grossmann *et al.* 1992)。另亦有使用離體葉片、懸浮細胞、藻類或浮萍、以及植株幼苗等生物體進行藥劑耐受性分析(Ma *et al.* 2000, Couderchet *et al.* 1998, Hans 1992),由於此等測試方法所需時間長、個體間差異大、耗用的檢測材料多、且呈現的傷害為生理生化上的整體反應,無法得知可能之作用機制。細胞感測器主要的原理為微生物或單一細胞富含多種酵素調控的反應,當生物活性物質引起微生物生理代謝異常,產物含量的變化與反應程度具有線性關係(Lei *et al.* 2006, Yagi *et al.* 2007)。此等細胞感測器具有操作簡易、快速、及可大量篩選等優點,但辨識感測物質的專一性較差,故有基因重組細胞感測器之衍生應用。本研究以阿拉伯芥的 CBL 及 KARI 為感測之標的酵素,經建構後轉殖至大腸桿菌篩選鏈黴菌發酵液的除草活性。

自阿拉伯芥植株葉片中分別增幅 CBL 及 KARI 基因,經解序及比對開放框架序列長度分別為 1,395 與 1,776 bps,確認與 NCBI GenBank (No.NM_115564 及 No.NM_001203198)登錄者相同。經由 IPTG 添加於含阿拉伯芥 CBL 與 KARI 外源基因的大腸桿菌菌液中,即可分別誘導 CBL 與 KARI 外源蛋白質的大量表現,由於本試驗使用大腸桿菌 BL21(DE3) pLysS 菌株為寄主,因此菌株可表達 T7 溶菌酶(lysozyme),而可抑制 T7 RNA 聚合酶於 IPTG 誘導前的作用,從而穩定 CBL 與

KARI 的表現(Fig.2)及大腸桿菌細胞的正常生長。Ravanel 與 Douce (1996)亦曾於大腸桿菌 BL21(DE3)菌株表現阿拉伯芥 CBL。

含 CBL 與 KARI 大腸桿菌菌液之酵素活性分析結果，由 cysteine 合成量與 NADPH 減少量分別於波長 560 與 340 nm 的吸收值具線性關係，顯示由大腸桿菌表現的此 2 蛋白質具有 CBL 與 KARI 的酵素活性，且分別以 AVG 與 CPDA 為抑制劑建立 CBL 與 KARI 酵素活性測試之檢量線， R^2 值皆約為 0.95。採集及鑑定的鏈黴菌經基礎培養基發酵後，以發酵液初步測試大花咸豐草離體葉片褐化反應，選出可造成 100% 褐化的 S4、S7 及 S9 等 3 菌株(資料未呈現)。利用本研究建構的有 CBL 與 KARI 外源蛋白質的大腸桿菌菌液，檢測 S4、S7 及 S9 鏈黴菌之發酵液，結果 S4、S7 及 S9 鏈黴菌發酵液對 CBL 活性的抑制量皆低於 $0.02 \text{ U } \mu\text{mole}^{-1}$ ，對 CBL 無明顯抑制現象，然而此 3 菌株對 KARI 活性的抑制較為明顯，S9 菌株發酵液完全無抑制效果，S7 為 S4 菌株發酵液的 3 倍抑制量。前人研究發現 phaseolotoxin (菜豆菌毒素)、rhizobitoxin (根瘤菌素)及 cineole (桉葉素)分別作用於胺基酸合成中 ornithine carbamyl transferase (OCT)、cystathionine- β -synthase (CBS)及 asparagine synthetase 等酵素(Ferguson and Johnston 1980, Yuan and Hsieh 2012)，亦具除草潛力。

本研究由大腸桿菌大量表現 CBL 與 KARI 的細胞感測平台，首度應用於篩檢抑制此 2 酵素活性的微生物除草潛力物質。此檢測方法僅需 300 μl 檢體，一旦轉殖菌株建構完成，可大量繁殖分裝及冷凍保存，欲測試前取出活化後，1 小時之內即可於特定波長的吸收值檢出其活性，具有操作簡易及感測靈敏之特性。

參考文獻

- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Couderchet M, J Schmaluss, P Boger (1998) A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. *Pestic. Sci.* 52: 381-387.
- Droux M, S Ravanel, R Douce (1995) Methionine biosynthesis in higher plants: II. Purification and characterization of cystathionine β -lyase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 316: 585-595.
- Ferguson AR, JS Johnston (1980) Phaseolotoxin : chlorosis, ornithine accumulation and

- inhibition of ornithine carbamoyltransferase in different plants. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 269-275.
- Grossmann K, R Berghaus, G Retzlaff (1992) Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research. Comparison with screens using alga, germinating seeds and whole plants. *Pestic Sci.* 35: 283-289.
- Hans HH (1992) *In vitro* systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pest. Sci.* 35: 277-281.
- Heap IM (2013) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online internet. Nov. 23, 2013. www.weedscience.com.
- Hollis RP, K Killham, LA Glover (2000) Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to Eukaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1676-1679.
- Kao-Kniffin J, SM Carver, A DiTommaso (2013) Advancing Weed Management Strategies Using Metagenomic Techniques. *Weed Sci.* 61: 171-184.
- Lei Y, W Chen, A Mulchandani (2006) Microbial biosensors. *Analy. Chimica Acta.* 568:200-210.
- Ma JY, J Chen, WG Chai, MG Li, SG Wu (2000) Study on microscreening method to evaluate herbicidal activity using *Chlorella pyrenoidosa*. *China. J. Pest. Sci.* 2: 29-34.
- Malandain C, F Fayolle, H Bedouelle (2005) Biosensors for the environment. *Oil & Gas Sci. and Technol. Rev.IFP*, 60: 887-897.
- Mitchell RJ, MB Gu (2004) An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 46-52.
- Negrutiu I, DD Brouwer, R Dirks, M Jacobs (1985) Amino acid auxotrophs from protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*, Viviani. *Mol. Gen. Genet.* 199: 330-337.
- Pestemer W. P Günther (1995) Growth inhibition of plants as a bioassay for herbicide analysis. *Chem. Plant Protect.* 11: 219-231.
- Ravel S, D Job, R Douce (1996) Purification and properties of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 320: 383-392.
- Riedel SM, AC Elliott, M Yeung (1998) High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery: Automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pest. Sci.* 54: 327-337.

- Riedel K, KP Lange, HJM Kuhn, P Ott, F Scheller (1990) A microbial sensor for BOD. *Water Res.* 24: 883-887.
- Rogers KR (2006) Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Analy. Chimica Acta* 568: 222-231.
- Tresch S (2013) Strategies and future trends to identify the mode of action of phytotoxic compounds. *Plant Sci.* 212: 60-71.
- Turner WL, KE Pallett, PJ Lea (1998) Cystathionine β -lyase from *Echinochloa colonum* tissue culture. *Phytochemistry* 47: 189-196.
- Schmidt RR (1997) HRAC classification of herbicides according to mode of action. Bright on crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, pp. 1133-1140.
- Shao CY, CJ Howe, AJR Porter¹, LA Glover (2002) Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5026-5033.
- Yagi K (2007) Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl. Microbil. Biotechnol.* 73: 1251-1258.
- Yuan CI (2009) Research and development of cell-based sensors for toxicity testing of environmental pollutions. *Agric. Biotech. Indus. Q.* No.20.61-66.
- Yuan CI, YC Hsieh (2012) Research and development of bioherbicides. *Agric. Policy Rev.* 480:88-94.