

网络出版时间:2015-06-30 13:47 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.08.001  
网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.001.html

# 土壤宏基因组中抗草甘膦新基因的克隆及其功能验证

马 建<sup>1</sup>, 王云鹏<sup>1,2</sup>, 韦正乙<sup>2</sup>, 孙康泰<sup>3</sup>, 邢少辰<sup>1,2</sup>, 王呈琰<sup>1</sup>

(1 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033;  
3 中国农村技术开发中心, 北京 100045)

**【摘要】**【目的】从土壤宏基因组中克隆新的抗草甘膦新基因, 并对其功能进行验证, 为培育抗除草剂转基因新品种奠定基础。【方法】利用被草甘膦污染的土壤建立宏基因组文库, 经筛选从中成功克隆了一个新的具有草甘膦抗性的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)基因(命名为 *soilA*)。构建了 *Prrn* 启动子驱动 *soilA* 基因的原核表达载体 pSYTH-*soilA*, 将其导入大肠杆菌进行原核草甘膦抗性试验, 构建了 35S 启动子驱动 *soilA* 基因的植物表达载体 pC330E, 利用农杆菌介导法转化烟草, 并对经 PCR 和胶体金试纸条鉴定的转基因烟草植株进行草甘膦耐受能力检测。【结果】序列分析表明, 所获得的 *soilA* 基因长 1 347 bp, 编码 448 个氨基酸, 经 BLAST 分析, 结果表明其属于 Class II 型 EPSPS 基因家族。原核表达 *soilA* 可使受体菌具有耐受 1 200 mmol/L 草甘膦。构建 *soilA* 植物表达载体 pC330E, 通过农杆菌介导法将其导入烟草, 经 PCR 和胶体金试纸条检测共获得 107 株阳性烟草植株, 经过喷雾试验获得了 3 株高耐受草甘膦植株, 这 3 株转基因烟草最高可耐受 200 mmol/L 草甘膦。【结论】新克隆的编码 EPSPS 的 *soilA* 基因能够提高受体材料的草甘膦耐受能力。

**【关键词】** 草甘膦抗性; 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶; 宏基因组; 烟草

**【中图分类号】** Q78

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2015)08-0086-07

## Cloning and functional analysis of a novel glyphosate resistant gene *soilA* from soil metagenome

MA Jian<sup>1</sup>, WANG Yun-peng<sup>1,2</sup>, WEI Zheng-yi<sup>2</sup>, SUN Kang-tai<sup>3</sup>,  
XING Shao-Chen<sup>1,2</sup>, WANG Cheng-Yan<sup>1</sup>

(1 Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033, China;

3 China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China)

**Abstract:** 【Objective】 This paper aimed to clone and identify a novel glyphosate resistant gene from the metagenome derived from glyphosate-contaminated soil, which would lay foundation for cultivating new herbicide resistant and genetically modified breeds. 【Method】 In the present study, a novel glyphosate resistant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene, named *soilA*, was isolated from the metagenomic library derived from glyphosate-contaminated soil. The cloned *soilA* gene was driven by *Prrn* promoters to construct prokaryotic expression vector pSYTH-*soilA*, which was introduced into *E. coli* for resistance analysis against glyphosate, and driven by 35S promoters to construct plant expression vector pC330E. Then, vector pC330E was introduced into tobacco for resistance analysis against glyphosate. 【Result】 The sequence analysis suggested that *soilA* consisted of 1 347 bp and encoded a polypeptide of 448 amino acids. BLAST analysis showed that it belonged to the Class II family of EPSPS genes. Expression of

【收稿日期】 2014-01-24

【基金项目】 国家转基因新品种培育重大专项(2008ZX08003-001); 吉林省科技厅创新工程项目(20076021)

【作者简介】 马 建(1980-), 男, 吉林长春人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: winter0106@163.com

【通信作者】 邢少辰(1964-), 男, 河北邢台人, 研究员, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: xingsc@cjaas.com

*soilA* in prokaryotic system conferred the host cell could tolerate 1 200 mmol/L glyphosate solution. A plant expression vector pC330E harboring *soilA* gene was constructed and transferred into tobacco genome via agrobacterium-mediated transformation. A total of 107 transgenic plants were obtained by molecular identification, 3 of which were selected by the spray of glyphosate solution. Resistance experiment showed that the 3 transgenic plants could tolerate the spray of 200 mmol/L glyphosate solution. 【Conclusion】 The *soilA* gene enhanced the glyphosate tolerance of receptor materials.

**Key words:** glyphosate; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; metagenome; tobacco

莽草酸途径是植物和微生物芳香族氨基酸合成的重要途径, 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS, EC2. 5. 1. 19)是莽草酸途径的关键酶, 其可催化 3-磷酸莽草酸(S3P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)生成 5-烯醇式丙酮酸-3 磷酸莽草酸(EPSP)。除草剂草甘膦是 PEP 的结构类似物, 能与 PEP 竞争性抑制 EPSPS 的活性<sup>[1]</sup>, 从而阻断芳香族氨基酸的生物合成, 最终导致植物死亡。有些微生物来源的 EPSPS 不受草甘膦抑制, 具有草甘膦抗性, 这一途径是生物产生草甘膦抗性的被动方式。草甘膦作为一种广谱灭生性、内吸传导型除草剂, 自 1974 年在美国注册登记以来, 至今已在 100 多个国家注册, 成为世界上使用面积最大的除草剂品种<sup>[2]</sup>, 其在去除田间杂草的同时也会对农作物的正常生长造成一定的危害, 因此培育具有草甘膦抗性的转基因植株一直是育种公司关注的重点, 在诸多转基因作物中, 以抗草甘膦转基因大豆的种植推广面积增幅最为明显。至 2011 年, 美国抗草甘膦大豆、水稻、谷物的种植面积就达到其各自总面积的 96% 以上<sup>[3]</sup>。新的调查结果表明, 绝大多数种植者拒绝接受传统种植方式所支付的每 hm<sup>2</sup> 30~920 美元的人工除草费用, 因此由转基因农作物和除草剂组成的新型农业耕种模式正在形成<sup>[4]</sup>。

宏基因组的概念最初是由德国微生物学家 Handelsman 等<sup>[5]</sup>于 1988 年提出。由于自然界中 90% 以上的微生物无法进行人工培养<sup>[6-7]</sup>, 而宏基因组学则是以某一环境中的微生物群体为研究对象, 通过直接研究群体中的遗传信息解决了这一难题, 其突出贡献在于对新功能基因的挖掘。

本研究通过筛选不同来源的宏基因组文库, 获得携带草甘膦抗性基因的大肠杆菌, 经序列分析后构建含有抗草甘膦基因的植物表达载体, 利用农杆菌介导法转化烟草, 获得抗草甘膦转基因烟草后代材料, 经分子鉴定及生物学抗性分析, 在烟草中验证新基因的生物功能, 以期进一步创制新材料, 为培

育抗除草剂转基因作物新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料: 大花烟草 (*Nicotiana tabacum cv. Grandiflora*) 为吉林省农业科学院农业生物技术研究保存。

菌种质粒: 大肠杆菌 Mach1、pEASY、pSYTH、pCAMBIA3301 和农杆菌 EHA105 为吉林省农业科学院农业生物技术研究保存。

主要试剂: T4 DNA 连接酶、Transtar Fast *pfu* 酶购自北京全式金生物技术有限公司, PCR 回收试剂盒、胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司, M9 培养基和草甘膦购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 1.2 方法

1.2.1 宏基因组文库的构建和抗草甘膦新基因的获得 依照赵裕栋等<sup>[8]</sup>的方法提取草甘膦污染土壤总 DNA, 并按照文献<sup>[9-10]</sup>的方法, 利用琼脂糖凝胶电泳对土壤总 DNA 进行纯化, 去除腐殖酸等杂质, 构建 *Not* I 部分酶切的宏基因组文库, 将文库中宏基因的全部克隆在含有 200 mg/L 草甘膦的 M9 固体培养基上进行筛选, 选取 72 h 内出现的单菌落。对草甘膦抗性克隆提取质粒, 交由华大基因有限公司, 利用通用引物 M13F 和 M13R 进行测序。测序结果经 DNAMAN 拼接, 用 vector NTI 分析其中包含的开放式阅读框(ORF), 用 DNA 2.0 分析所获得的 ORF 是否与 SD 序列相连以及基因上游是否存在启动子, 进而确定其是否具有转录翻译的基础; 然后将所获得的具有转录翻译可能的 ORF 用 NCBI 中的 BLAST 软件进行在线比对分析, 将获得的抗草甘膦新基因命名为 *soilA*, 使用 DNAMAN 绘制 *soilA* 与其他 EPSPS 基因的系统进化树。

1.2.2 抗草甘膦基因 *soilA* 的原核表达 根据测序及分析结果, 设计 *soilA* 的引物 Primer1(5'-agtccatggatATGTCTCATGGATCGGGCCCG-3')和 Pri-

mer2(5'-atc ggtgaccTCACGCGATCCTCGCGCCG-AG-3'),引物序列中下划线部分为酶切位点,小写字母部分为保护碱基。利用 Transtar Fast *pfu* 酶进行 PCR 扩增获得片段中的 EPSPS 基因。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L:2 $\times$ Transtar Fast *pfu* 酶 25  $\mu$ L, Primer1 2  $\mu$ L, Primer2 2  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,58  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环;然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 PCR 回收试剂盒回收 PCR 产物,连接到经 *Pvu* II 酶切的载体 pSYTH 中,将得到重组子命名为 pSYTH-soilA。

将含有载体 pSYTH 和 pSYTH-soilA 的大肠杆菌 Mach1 按照 1:200 的体积比,分别接种于含有 0,100,200,400,800,1 200,1 600 mmol/L 草甘膦的 M9 液体培养基上,培养 12 h 后测定其 OD<sub>600</sub> 值。用枪头蘸取少量菌液在含 200 mg/L 草甘膦的 M9 固体培养基表面标记“EPSPS”字样,同时用含有质粒载体 pSYTH 的大肠杆菌 Mach1 作对照,在平板表面标记“CK”字样,37  $^{\circ}$ C 培养 48 h。

1.2.3 植物表达载体的构建及鉴定 以 pEASY-soilA 为模板,用高保真酶通过 PCR 扩增获得 1 347 bp 的 *soilA* 片段,用 *Nco* I 和 *Bst*E II 双酶切该片段,然后与 *Nco* I 和 *Bst*E II 双酶切 pCAMBIA3301 质粒释放的大片段进行连接,将获得的经酶切、测序证实无误后的植物表达载体命名为 pC330E。

1.2.4 转基因植株的转化和筛选 利用农杆菌介导的叶盘法转化烟草植株,放置在含有体积分数 0.2% 草丁膦的筛选继代培养基上培养 2~3 周,待不定芽长出 3~4 片小叶后,将不定芽剪下后转入含有体积分数 0.5% 草丁膦的生根培养基中培养。约 2 周后不定芽生根,获得再生植株。

1.2.5 转基因植株的分子检测 按照胶体金试纸条使用说明书,检测获得的阳性植株。同时,采用 CTAB 法提取抗性再生烟草植株的总 DNA,用 PCR 扩增检测 *soilA* 基因是否插入烟草基因组中。*soilA* 基因检测用的引物为 Primer3(5'-GGAGT-GACGTTGGGCATC-3')和 Primer4(5'-ACTCG-TGTGACGGCAGGAC-3),PCR 扩增片段预期长度为 726 bp。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L:2 $\times$ Transtar Fast *pfu* 酶 12.5  $\mu$ L,Primer3 1  $\mu$ L,Primer4 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 PCR 回收试剂

盒回收 PCR 产物,连接到经 *Pvu* II 酶切的载体 pSYTH 中,将得到重组子命名为 pSYTH-soilA。

1.2.6 转基因植株的抗性分析 对经 PCR 鉴定和胶体金试纸条检测为阳性的植株,喷洒 50 mmol/L 草甘膦溶液,存活的阳性植株再依次进行 100 和 150 mmol/L 草甘膦溶液的喷洒试验,设置野生型植株作为阴性对照。最后,挑选经 150 mmol/L 草甘膦溶液喷洒后几乎不受影响的 3 个转基因植株,再喷施 200 mmol/L 草甘膦溶液,同时设置非转基因材料作为阴性对照,验证转基因植株的生物学功能,拍照并记录试验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗草甘膦 EPSPS 基因的获得与序列分析

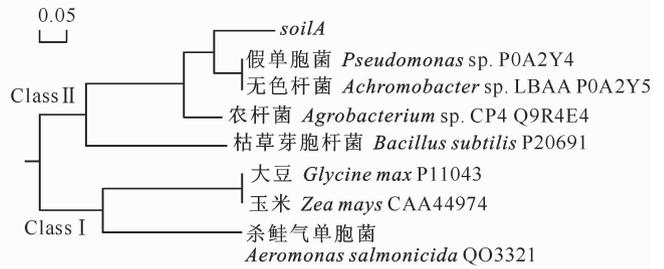
通过筛选土壤宏基因组文库,获得了抗草甘膦的 EPSPS 家族新基因。测序后,利用 NCBI 中的 BLAST 软件进行比对分析,发现编码 EPSPS 新基因,其开放阅读框长度为 1 347 bp,编码 448 个氨基酸。其氨基酸序列与大豆 cp4-EPSPS 有 79% 的同源性,与已经公布的专利序列<sup>[11-14]</sup> 同源性最高为 79%,将编码 EPSPS 的新基因命名为 *soilA* (GenBank 登录号 KJ000085)。*soilA* 编码蛋白氨基酸序列如图 1-A 所示,与 EPSPS CP4 蛋白氨基酸序列的比较结果表明,两者之间有 68.7% 的同源性。系统进化分析结果(图 1-B)表明,*soilA* 基因属于 Class II 型的 EPSPS 基因。

### 2.2 *soilA* 基因的功能验证

按照图 2-A 所示,将新基因 *soilA* 连入载体 pSYTH 的 *Pvu* II 酶切位点,经 PCR 检测,结果(图 2-B)表明,成功构建了原核表达载体 pSYTH-soilA。将该载体与不携带 *soilA* 基因的表达载体 pSYTH 置于含有不同浓度草甘膦的 M9 液体培养基中培养,结果(图 2-C)发现,当草甘膦浓度不高于 1 200 mmol/L 时,携带 *soilA* 基因重组子的大肠杆菌能够正常增殖,基本不受草甘膦的影响,而携带对照载体 pSYTH 的大肠杆菌,在草甘膦浓度达到 100 mmol/L 时,其增殖生长便明显受到抑制。从图 2-D 可以看出,在含有 200 mmol/L 草甘膦的 M9 固体培养基上,标有“EPSPS”的字样明显变粗,说明携带 pSYTH-soilA 质粒的大肠杆菌能够正常生长,而“CK”字样仍然是当初接种时留下的划痕,说明携带 pSYTH 载体的大肠杆菌无法正常生长。

MSHSGSPPRATARKSADLRGSIRIPGDKSISHR  
 ALMLGGLASGETRITGLLQGDVLTATGRAM  
 QAMGARIRKEADTFIVDGVNGALLAPEAPL  
 DFGNAGTGCRLAMGLAGVYDFETTFGLDAS  
 LSRRPMARVLEPLREMGTVQVRAAGDRLPV  
 TLRGPKTPAPITYRVPVATAQVKSAVLLAGLN  
 APGITTVEIPVMTRDHTERMLEAFGAALSVET  
 DVSGVRTIRLDGRGKLTGQEIDVPGDPSSAAF  
 PLVAALIVPGSDITITNVLNPNRSRTGLLTLKE  
 MGGDIEVIGSRQVGGEDVADLRVRHSELSGV  
 TVPEERAASLIDEYPALAIAAAFAEGNTVMA  
 GLDELRVKESDRLAAIAAGLKRNGVDCEEGA  
 SSLVVRGRRDGGKGLGSAAGATVNTHLDRHIA  
 MSFLIFGLASEHPVTVDDVSMVATSFPEFMHL  
 MTSLGARIA

A



B

图 1 抗草甘膦基因 *soilA* 的序列分析

A. *soilA* 编码蛋白的氨基酸序列;B. *soilA* 与其他物种 EPSPS 基因的系统进化分析

Fig. 1 Sequence analysis of *soilA* gene

A. Amino acid sequence of *soilA*;B. Phylogenetic analysis of *soilA*

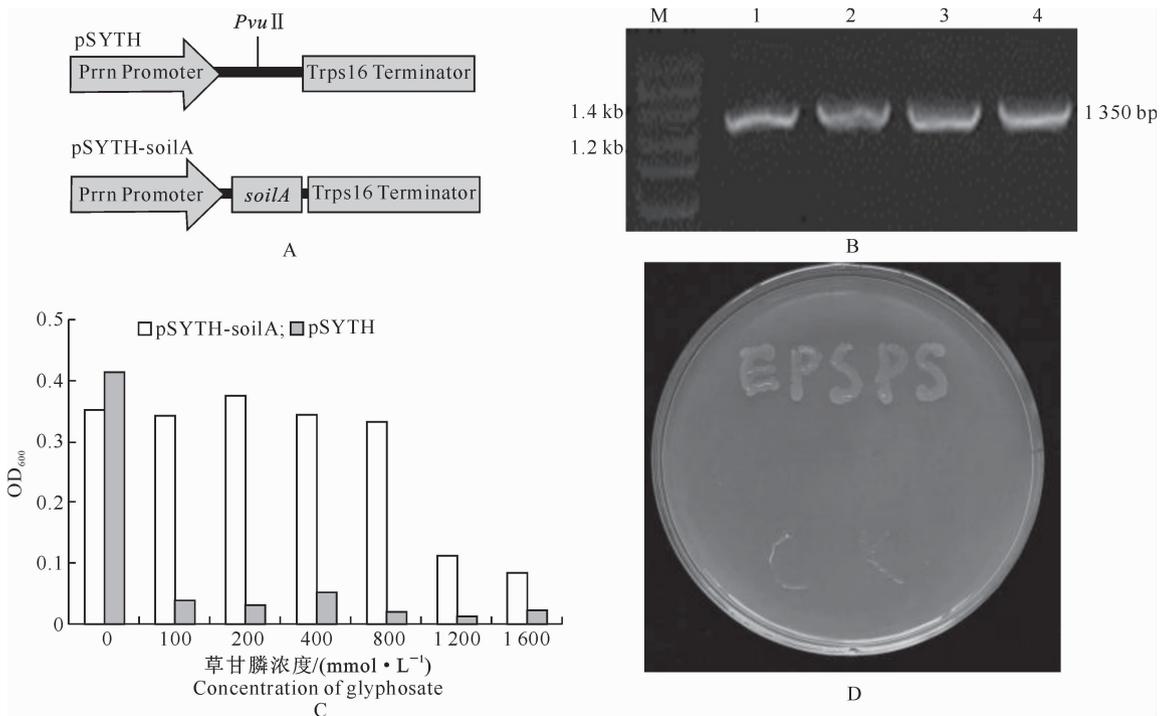


图 2 *soilA* 基因功能的原核表达检验

A. 原核表达载体 pSYTH 和 pSYTH-*soilA* 的结构;B. pSYTH-*soilA* 的 PCR 鉴定;M. 200 bp DNA ladder; 1~4. pSYTH-*soilA* 的 PCR 产物;C. 携带 pSYTH 和 pSYTH-*soilA* 的大肠杆菌在含不同浓度草甘膦的培养基中培养 12 h 的 OD<sub>600</sub>; D. 携带 pSYTH 和 pSYTH-*soilA* 的大肠杆菌在含 200 mmol/L 草甘膦 M9 固体培养基上的生长情况

Fig. 2 Prokaryotic expression of *soilA* in *E. coli*

A. Structure of prokaryotic expression vector pSYTH and pSYTH-*soilA*;B. Identification of pSYTH-*soilA* by PCR; M. 200 bp DNA ladder;1-4. PCR products of pSYTH-*soilA*;C. OD<sub>600</sub> values of *E. coli* with pSYTH and pSYTH-*soilA* cultured in medium containing different concentrations of glyphosate for 12 h;D. Growth of *E. coli* with pSYTH and pSYTH-*soilA* cultured in the M9 medium containing 200 mmol/L glyphosate

### 2.3 植物表达载体 pC330E 的构建及鉴定

为了验证新基因 *soilA* 是否可以在植物中有效表达,以模式植物烟草为材料,构建该基因的植物表达载体。如图 3-A 所示,通过亚克隆将 pCAM-BIA3301 上的 *GUS* 基因替换成 *soilA* 基因,重组后

的载体经 *Nco* I 和 *Bst*E II 双酶切,释放出长度约为 1 350 bp 的片段(图 3-B),最终经测序证实插入方向及序列正确无误,说明得到植物表达载体,并将其命名为 pC330E。

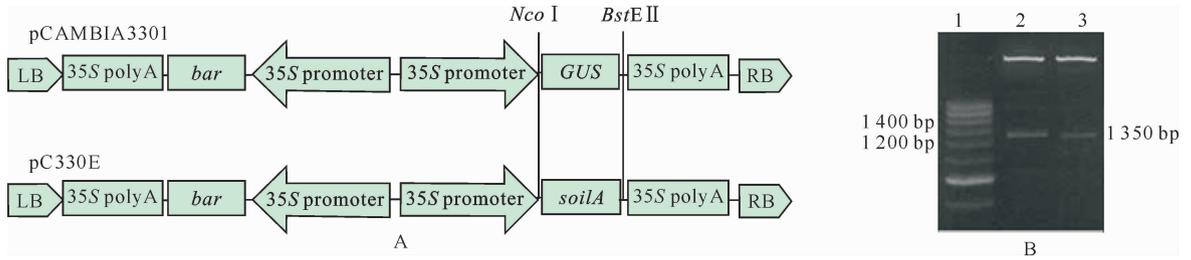


图 3 *soilA* 基因表达载体的构建及鉴定

A. 植物表达载体 pCambia3301 和 pC330E 的 T-DNA 结构; B. pC330E 的酶切鉴定, 1. 200 bp DNA ladder, 2~3. *Nco* I 和 *BstE* II 酶切 pC330E

Fig. 3 Construction and identification of plant expression vector

A. Structure of T-DNA region of plant expression vector pCambia3301 and pC330E; B. Identification of pC330E by digestion, 1. 200bp DNA ladder; 2-3. pC330E digested by *Nco* I and *BstE* II

## 2.4 抗草甘膦烟草再生植株的获得及分子检测

胶体金试纸条检测结果见图 4。

抗草甘膦烟草再生植株的获得及 PCR 鉴定和

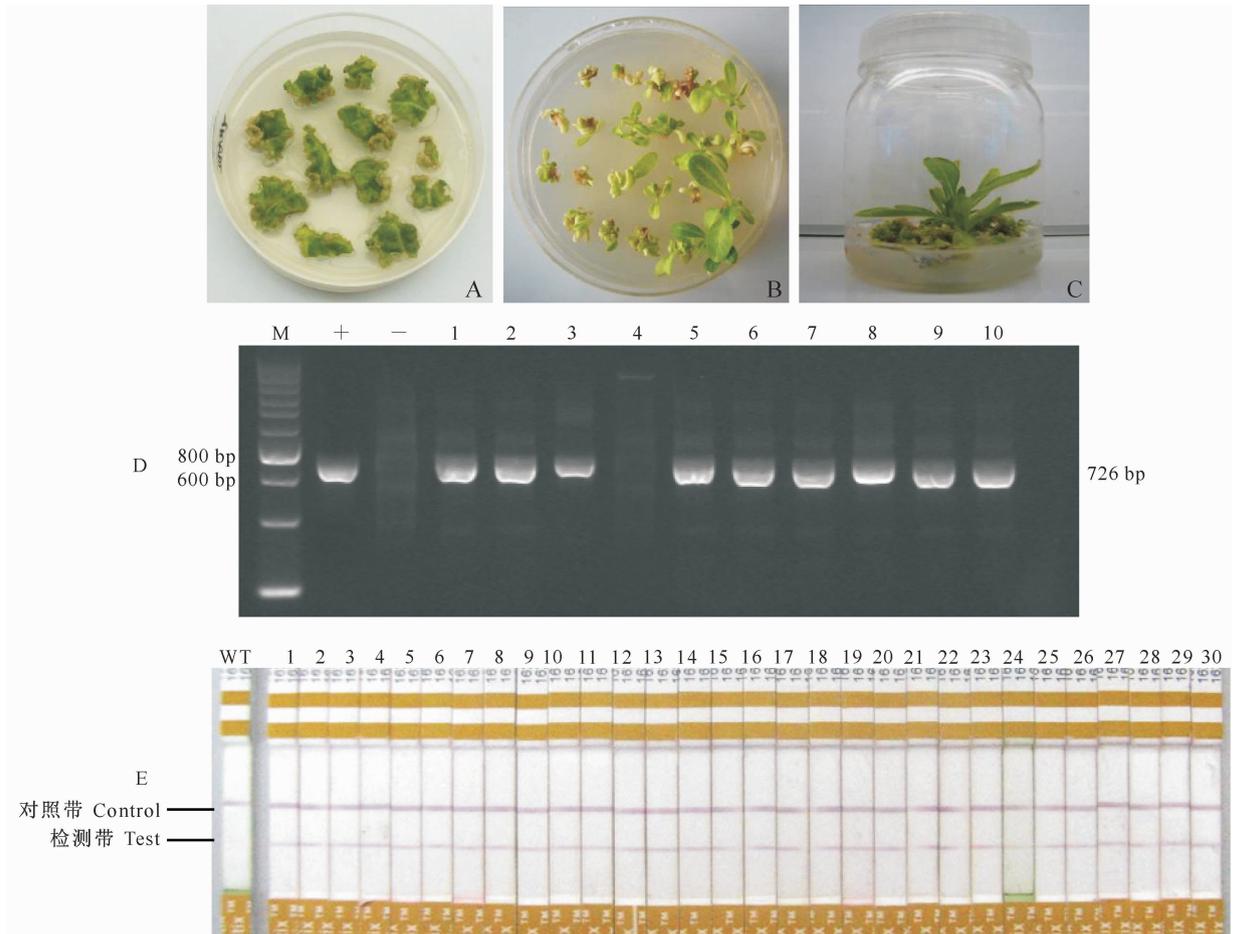


图 4 抗草甘膦烟草再生植株的获得及 PCR 鉴定和胶体金试纸条检测结果

A. 外植体的分化; B. 抗性苗的筛选; C. 生根; D. PCR 检测; M. 200 bp DNA ladder; +. 质粒 pC330E; -. 非转基因植株; 1~10. 部分转化植株; E. 部分转基因植株的胶体金试纸条检测; WT. 非转基因植株; 1~30. 部分转化植株

Fig. 4 Obtainment of regenerated resistant plants and detection by PCR amplification

A. Explant differentiation; B. Screening of resistant plant; C. Rooting plantlets; D. PCR detection; M. 200 bp DNA ladder; +. Plasmid pC330E as positive control; -. Untransformed plant; 1-10. Some putative transgenic plants; E. Detection of *bar* gene expression by QuickStix™ strip; WT. Untransformed plant; 1-30. Some putative transgenic plants

观察发现,烟草侵染 15 d 后出现不定芽,20 d 左右不定芽长出 3~4 片叶,剪下后转入生根培养基中,约 2 周后不定芽生根,获得抗性再生植株,共计 132 株(图 4-A~C)。用 *soiA* 基因特异性引物 Primer3 和 Primer4 进行 PCR 检测,共检测出阳性植株 107 株(图 4-D)。胶体金试纸条测试结果表明,107 株 PCR 阳性植株中与 *soiA* 基因紧密相连的 *bar* 基因能够正常表达,因此推断这 107 个转化植株中的 *soiA* 基因也能够正常表达(图 4-E)。

## 2.5 转基因烟草的草甘膦抗性鉴定

所获得的 107 株阳性植株依次经 50, 100, 150

mmol/L 草甘膦喷洒 14 d 后,分别有 47, 31, 3 株存活下来,而非转基因烟草全部死亡,并且最后存活下来的 3 株转基因植株几乎完全不受草甘膦影响。将这 3 株转基因植株与非转基因植株(对照组)喷施 200 mmol/L 草甘膦进行抗性鉴定,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,喷施 200 mmol/L 草甘膦 14 d 后,非转基因植株已完全枯萎死亡,而 3 株转基因植株能够耐受草甘膦,均可正常生长。上述抗性鉴定结果表明,*soiA* 基因的表达能够赋予烟草植株耐受较高浓度草甘膦的能力。

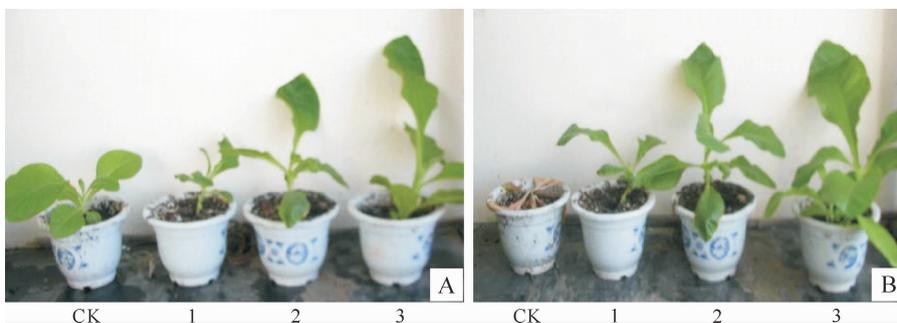


图 5 转 *soiA* 基因烟草的草甘膦抗性鉴定

A. 喷施草甘膦前;B. 喷施草甘膦 14 d 后;CK. 非转基因植株;1~3. 转基因植株

Fig. 5 Resistance verification of transgenic tobaccos modified with *soiA* gene by spraying glyphosate

A. Before spraying of glyphosate; B. 14 days after spraying of glyphosate; CK. Untransformed plant; 1-3. Transgenic plant

## 3 讨论

EPSPS 是草甘膦类除草剂的惟一靶向蛋白,其表达水平的高低以及其对草甘膦亲和能力的大小直接决定了植物对草甘膦类除草剂的耐受性。因此,利用基因工程技术将 EPSPS 基因引入受体植物基因组,从而实现过量表达 EPSPS 是当前抗草甘膦农作物转基因育种的主要方式<sup>[15-16]</sup>。本研究通过筛选土壤宏基因组分离得到 *soiA* 基因,经序列分析表明其属于 Class II 型的 EPSPS 基因家族,因此推测其具有草甘膦耐受的特性,后续的试验也印证了这个推测:将 *soiA* 基因导入原核生物系统表达,大肠杆菌可以耐受 1 200 mmol/L 草甘膦;构建植物载体将其导入真核模式植物烟草中,也能明显提高受体材料的草甘膦耐受性。

尽管有报道称连续喷洒草甘膦可能造成田间杂草对草甘膦抗性的提高<sup>[15]</sup>,但是本试验过程中所测试的转基因烟草植株和非转基因烟草植株遗传背景一致,因此不存在由于选择压力作用所导致的自发突变积累所造成的植株对草甘膦抗性的提高。同时,在连续喷洒的过程中,草甘膦的积累也随着喷洒

次数不断提高,虽然试验最终使用的草甘膦浓度为 200 mmol/L,但此时实际草甘膦积累量应远超过此水平,因此可以认为,所获得的 3 个最佳的烟草转基因植株可耐受至少 200 mmol/L 草甘膦水溶液(质量/体积分数约为 3.38%),该剂量高于其他已经报道的 EPSPS 转基因植物,如烟草为 1%<sup>[17]</sup>,转基因油菜为 2%<sup>[18]</sup>,转基因玉米为 3%<sup>[19]</sup>。可见该基因在今后的抗除草剂转基因作物育种中具有较好的推广应用潜力。

## [参考文献]

- [1] Schmid J, Amrhein N. Molecular organization of shikimate pathway in higher plants [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(4): 737-749.
- [2] Watrud L S, Lee E H, Fairbrother A, et al. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creep bentgrass with CP4 EPSPS as a marker [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 14533-14538.
- [3] Riar D S, Norsworthy J K, Steckel L E, et al. Adoption of best management practices for herbicide-resistant weeds in mid-southern united states cotton, rice, and soybean [J]. *Weed Technology*, 2013, 27(4): 788-797.
- [4] Riar D S, Norsworthy J K, Steckel L E, et al. Consultant per-

- spectives on weed management needs in midsouthern United States cotton: A follow-up survey [J]. Weed Technology, 2013, 27(4): 778-787.
- [5] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural Products [J]. Chem Biol, 1998, 5(10) R245-R249.
- [6] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [7] Torsvik V, Srheim R, Goksyrr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: A review [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1996, 17(3): 170-178.
- [8] 赵裕栋, 周俊, 何璟. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化 [J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1143-1150.  
Zhao Y D, Zhou J, He J. Optimization of soil microbial DNA isolation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(9): 1143-1150. (in Chinese)
- [9] 王云鹏, 马景勇, 马瑞, 等. 土壤宏基因组中抗草甘膦新基因的克隆与转化水稻的研究 [J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1190-1196.  
Wang Y P, Ma J Y, Ma R, et al. Cloning of new herbicide resistant gene in soil metagenomics and the generation of transgenic rice plants [J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(7): 1190-1196. (in Chinese)
- [10] 邢少辰, 王云鹏, 林春晶, 等. 草甘膦耐受型 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶及编码序列: 中国, 201210431741. 6 [P]. 2013-02-13.  
Xing S C, Wang Y P, Lin C J, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases and the coding sequence: CN, 201210431741. 6 [P]. 2013-02-13. (in Chinese)
- [11] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases; US, 5, 633,435 [P]. 1997-05-27.
- [12] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases; US, 5, 804,425 [P]. 1998-09-08.
- [13] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases; US, 6, 248,876 [P]. 2001-06-19.
- [14] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases; European, EP 0546090 [P]. 2006-07-19.
- [15] 谢龙旭, 徐培林, 聂燕芳, 等. 抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 545-550.  
Xie L X, Xu P L, Nie Y F, et al. Construction of a vector conferring herbicide and pest resistance in tobacco plant [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(5): 545-550. (in Chinese)
- [16] Tan S, Evans R, Singh B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops [J]. Amino Acids, 2006, 30: 195-204.
- [17] 孙鹤, 郎志宏, 陆伟, 等. 转 *2mG22epsps* 基因烟草的草甘膦耐受性分析 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(4): 100-106.  
Sun H, Lang Z H, Lu W, et al. Analysis of glyphosate tolerance in transgenic tobacco with *2mG22epsps* gene [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(4): 100-106. (in Chinese)
- [18] 王景雪, 赵福永, 徐培林, 等. 油菜转抗草甘膦、抗虫基因获得双抗植株 [J]. 遗传学报, 2005, 32(12): 1293-1300.  
Wang J X, Zhao F Y, Xu P L, et al. Development of transgenic oilseed plants resistant to glyphosate and insects [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(12): 1293-1300. (in Chinese)
- [19] 孙传波, 李海华, 郭嘉, 等. 农杆菌介导法向玉米茎尖导入抗草甘膦 EPSPS 基因的研究 [J]. 生物技术通报, 2011(3): 91-93.  
Sun C B, Li H H, Guo L, et al. Study on agrobacterium tumefaciens mediated transformation of EPSPS gene into shoot apical point of maize [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(3): 91-93. (in Chinese)