

研究报告

## 硝磺草酮抗性菌株的筛选及抗性基因的克隆表达

黄彦 夏冰洁 崔中利\*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点实验室 江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】从采集的土壤中筛选出硝磺草酮的抗性菌株,并从中克隆对羟基苯基丙酮酸双加氧酶抗性基因。【方法】以酪氨酸为唯一碳源,采用富集培养法筛选分离硝磺草酮抗性菌株,利用16S rRNA基因序列分析对菌株进行初步鉴定。通过PCR扩增获得其HPPD基因序列,构建pETH4表达载体并在大肠杆菌*Escherichia coli* BL21(DE3)中进行异源表达。通过检测色素在440 nm处的吸收值分析菌株*E. coli* BL21(DE3)-pETH4对硝磺草酮的抗性特性。【结果】在含10 mmol/L硝磺草酮和1 g/L酪氨酸的选择培养基上,分离得到7株硝磺草酮抗性细菌,1株为不动杆菌属,2株为无色杆菌属,4株为假单胞菌属。从抗性最佳的*Pseudomonas* sp. AM-H4中扩增得到HPPD的基因片段为1 056 bp,其序列与*Acinetobacter baumannii*基因组中HPPD的基因序列相似性达到99%,341位点由天冬氨酸突变为丙氨酸。HPPD基因在大肠杆菌中实现异源表达,蛋白分子量大小约40 kD。菌株*E. coli* BL21(DE3)-pETH4在40  $\mu$ mol/L硝磺草酮酪氨酸LB培养基中的色素吸收值显著降低,能够耐受高于200  $\mu$ mol/L的硝磺草酮。【结论】克隆获得的HPPD具有良好的硝磺草酮抗性,将在新除草剂抗性作物选育中有一定的应用潜力。

**关键词:** 硝磺草酮,对羟基苯基丙酮酸双加氧酶,抗性菌株,基因克隆与表达

## Isolation of mesotrione-resistant strain and cloning and expression of HPPD

HUANG Yan XIA Bing-Jie CUI Zhong-Li\*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** [Objective] The mesotrione-resistant strain was isolated from soil, and the resistant gene 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase was cloned and characterized. [Methods] Using tyrosine as the sole carbon source, the strain was isolated by gradient enrichment culture. The isolated strains were identified based on 16S rRNA gene sequence. The resistant gene 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase was cloned by PCR amplification using the genomic DNA as a template. The expression plasmid pETH4 was constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The mesotrione-resistant property of *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 was tested by measuring the absorbance at 440 nm. [Results] Seven bacterial strains, which could grow on MSM medium containing 10 mmol/L mesotrione and 1 g/L tyrosine, were isolated. They were identified as *Acinetobacter* sp., *Achromobacter* sp. and *Pseudomonas* sp.. PCR fragment of 1 056 bp was obtained from *Pseudomonas*

\*通讯作者: ✉: czl@njau.edu.cn

收稿日期: 2014-12-18; 接受日期: 2015-02-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-17

sp. AM-H4, which exhibited the best resistance to mesotrione. The cloned HPPD gene shared 99% sequence identity with that from *Acinetobacter baumannii*, replacing aspartate-341 with alanine. The protein of HPPD was expressed in *E. coli* BL21(DE3) with the molecular mass of 40 kD. The absorbance of brown pigment produced by *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 in tyrosine-LB culture was significantly reduced in the presence of 40  $\mu\text{mol/L}$  mesotrione. In addition, the brown pigment was still visible when the concentration of mesotrione was greater than 200  $\mu\text{mol/L}$ . **[Conclusion]** The HPPD gene with high mesotrione-resistance was obtained in this study, which maybe a novel gene source for the application in breeding of herbicide-resistant crops.

**Keywords:** Mesotrione, 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, Resistant strain, Gene cloning and expression

非选择性广谱除草剂及其相应的抗性植物是目前应用的杂草控制模式之一。近二十年来,抗草甘膦转基因作物的广泛种植造就了草甘膦成为全球使用量最大的除草剂。但目前已出现了 29 种抗草甘膦超级杂草,因此开发新型除草剂及其抗性植物的需求日益迫切<sup>[1-2]</sup>。三酮类(Triketones)除草剂是新近开发的一类白化型除草剂,敏感杂草通过幼根吸收传导,竞争抑制对羟基苯丙酮酸双加氧酶(4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD, EC1.13.11.27),抑制尿黑酸的合成,使质体醌和生育酚的生物合成受阻,导致植物出现白化、生长迟缓等症状最终杀死植物<sup>[3-4]</sup>。以 HPPD 为靶标的除草剂选择性地用于玉米、大豆和其他双子叶植物。先正达(Syngenta)公司开发的硝磺草酮(Mesotrione)<sup>[5]</sup>,于 2006 年在我国东北地区推广销售,成为玉米田最受欢迎的除草剂品种之一。硝磺草酮主要防治大多数阔叶杂草及少数禾本科杂草,并能有效防控对草甘膦、ALS 抑制剂和三氮苯产生抗性的杂草(包括苋、藜和狐尾草等),对后茬作物安全,具有很好的开发应用前景。

为了扩大三酮类除草剂的除草谱以及用于其他敏感作物,通过基因工程技术手段构建具有 HPPD 抑制剂抗性的转基因植物是有效的方法<sup>[6]</sup>。目前已有两种 HPPD 抑制剂抗性的转基因大豆正在美国农业部的审批过程中<sup>[7-8]</sup>,前者在大豆中大量表达来源于 *Pseudomonas fluorescens* 的 HPPD 突变体,使其耐受异恶唑草酮(Isoxaflutole)<sup>[9]</sup>,后者则是利用来源于燕麦(*Avena sativa*)的 HPPD 突变体对抑制剂

较低的底物亲和力,从而耐受硝磺草酮和异恶唑草酮<sup>[10]</sup>。转基因作物的创制过程中,性能优良的功能基因是转基因的关键。近年来不同微生物和植物来源的 HPPD 基因相继被克隆表达<sup>[11-13]</sup>,但有关除草剂抗性 HPPD 基因筛选和利用的报道很少。本研究在分离鉴定抗硝磺草酮细菌的基础上,进一步对其硝磺草酮抗性基因进行了克隆及重组表达研究,旨在为培育除草剂抗性植物提供候选微生物及基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 主要试剂:** 酵母粉和蛋白胨,英国 OXOID 公司;氨苄青霉素钠(Amp)、IPTG 和琼脂糖,上海生工生物工程有限公司;DNA Marker、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T Vector,大连宝生物公司;细菌 DNA 提取试剂盒和 PCR 胶回收试剂盒,北京百泰克生物技术有限公司;引物合成和测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成;硝磺草酮由江苏省农科院李永丰实验室提供;其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 主要仪器:** Tanon 2500 凝胶成像系统,上海天能科技公司;MyCycler<sup>TM</sup> PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;核酸电泳仪和蛋白垂直电泳仪,北京市六一仪器;Beckman 台式高速冷冻离心机,美国 Beckman 公司;UV-2401 紫外可见分光光度计,日本 SHIMADZU 公司;多功能酶标仪,奥地利 TECAN 公司。

## 1.2 培养基及溶液配制

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 蒸馏水 1 L, 调 pH 至 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。固体培养基加琼脂 15 g/L。

基础无机盐培养基(MSM, g/L): NaCl 1.0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

酪氨酸母液(100 g/L): 称取 1 g 酪氨酸溶于 10 mL 2 mol/L NaOH, 过滤除菌。

硝磺草酮母液(200 mmol/L): 称取 6.78 g 硝磺草酮溶于 10 mL DMSO 溶剂, 过滤除菌。

酪氨酸 LB 培养基(TLB): 在已灭菌的 100 mL LB 培养基中加入 1 mL 过滤除菌的酪氨酸母液, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0。

酪氨酸无机盐培养基(TMSM): 在已灭菌的 100 mL MSM 中加入 1 mL 过滤除菌的酪氨酸母液, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0。

硝磺草酮酪氨酸无机盐培养基(MTMSM): 在 100 mL TMSM 中分别加入 1、2、3、4、5 mL 过滤除菌的硝磺草酮母液, 硝磺草酮终浓度为 2、4、6、8 和 10 mmol/L。

## 1.3 抗性菌株的筛选分离

称取采集的土样 5 g 加入含有玻璃珠的 45 mL 无菌水中,  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡 2 h 后取出静置 5 min, 取 2 mL 上清液加入到含 2 mmol/L 硝磺草酮的 MTMSM 中,  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养 72 h。取上述培养液 2 mL 加入到含 4 mmol/L 硝磺草酮的 MTMSM 中,  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养 72 h。以此类推, 将前一轮培养液逐级加入 6、8、10 mmol/L 硝磺草酮的 MTMSM 溶液,  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养 72 h。同时取适量培养液划线接种于含 10 mmol/L 硝磺草酮的 LB 固体培养基。挑取能在含硝磺草酮平板上生长、菌落形态不同的单菌落反复划线纯化, 纯化菌株于  $-70^\circ\text{C}$  保存。

## 1.4 抗性菌株的 16S rRNA 基因序列分析及系统进化树构建

参照细菌基因组 DNA 提取方法提取菌株基因组 DNA, 采用细菌通用引物对 27F 和 1492R<sup>[14]</sup> 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系:  $10 \times \text{Taq}$  buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , 模板(40 mg/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , 27F (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 1492R (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Taq}$  酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为:  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $54^\circ\text{C}$  45 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 共 33 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min;  $4^\circ\text{C}$  保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 并利用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 测得的序列用 BLASTn 进行相似性搜索和同源性比对, 同时选择菌株 16S rRNA 基因在 EZTaxon-e (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 数据库进行比对, 选取与其同源性较高的相关序列, 利用 ClustalW 软件进行多重序列比对后, 采用 MEGA 6.0 软件分析, 通过邻接法构建抗性菌株的系统进化树<sup>[11]</sup>。

## 1.5 硝磺草酮抗性基因 *hppd* 的克隆

根据 CodeHop 在线分析软件 (<http://blocks.fhrc.org/codehop/codehop.html>) 设计简并引物 HPPD-CODEHOP-F 和 HPPD-CODEHOP-R, 用于扩增 *hppd* 基因的保守区域。产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 连接 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 送样测序。以扩增出 *hppd* 保守序列的菌株基因组为模板, 根据鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* 1656-2) 的 *hppd* 基因的全序列设计一对引物 HPPD-F1 和 HPPD-R1 (表 1), 采用 PCR 扩增其全长序列, 测序结果经信息学分析后提交至 GenBank 数据库。

## 1.6 载体的构建及异源表达

根据 HPPD 基因全序列信息设计特异性引物 HPPD-F2 和 HPPD-R2, 见表 1, 以基因组 DNA 为模板扩增 *hppd* 基因。回收 *hppd* DNA 片段, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 连至载体 pET-29a(+), 构建表达载体 pETH4, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。将含有

表 1 引物序列  
Table 1 Sequence of primers

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT
CODEHOP-F	GCTTTGGCTTAACATATATTGATCATTTAacncayaaybt
CODEHOP-R	TGCCTTTGCGTTGAATAATTtcaaraadat
HPPD-F1	ATGGATATTTTAGAGAACCC
HPPD-R1	TTATTTTGCTTCGAGCAC
HPPD-F2	GGAATTC <u>CATATGGATATTTTAG</u> <sup>a</sup>
HPPD-R2	CCGCTCGAGTTTTCCTC

注: 下划线为酶切位点.

Note: The underlined part are restriction enzyme sites.

阳性重组质粒和空质粒载体 pET-29a(+) 的表达菌株培养至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C、220 r/min 振荡诱导 12 h, 12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, -20 °C 保存。

用 200  $\mu$ L 无菌水重悬菌体, 取 40  $\mu$ L 菌体悬浮液, 加入 10  $\mu$ L 5 倍上样缓冲液, 沸水中裂解 5 min, 用 SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 7% 的乙酸脱色后观察。

### 1.7 HPPD 的硝磺草酮抗性测定

挑取 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 单菌落, 接种到含卡那霉素(50 mg/L)的 5 mL LB 试管中, 37 °C、200 r/min 振荡过夜。次日以 10% 的接种量转入含卡那霉素的 TLB 中(96 孔板, 200  $\mu$ L), 设置不同的硝磺草酮浓度梯度, 0、2、4、10、40、60、80、100、200  $\mu$ mol/L, 培养 1 d 后观察色素的漂白情况。同样以 10% 接种量转入含卡那霉素的 5 mL TLB 试管, 培养 1 d 后, 菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 200  $\mu$ L 至 96 孔板, 利用酶标仪测定  $\lambda_{440}$  处的吸收值<sup>[12]</sup>。利用 Origin 8.5 软件, 以硝磺草酮浓度为横坐标, 吸收值为纵坐标制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 硝磺草酮抗性菌株的分离

经富集培养, 从土壤中分离筛选到 7 株能利用酪氨酸为唯一碳源, 在含 10 mmol/L 硝磺草酮的基

础培养基中生长的细菌, 分别编号为 AM-H1、AM-H3、AM-H4、AM-H5、AM-H11、AM-H14 和 AM-H16。将抗性菌株分别接种于 MTMSM 和 TMSM 培养基, 37 °C 培养 48 h 后, 对培养基进行 200–350 nm 波长范围的紫外扫描, 扫描结果显示硝磺草酮( $\lambda_{256}$ )的含量未有明显降低, 表明筛选获得的菌株为硝磺草酮的抗性菌株而非其降解菌株。同时测定菌液的  $OD_{600}$ , 从图 1 可以看出硝磺草酮对菌体的生长速度具有一定的抑制, 其中 AM-H5 在培养过程中产生絮状菌体, 因此其  $OD_{600}$  测定均偏低, 抗性菌株 AM-H4 在 MTMSM 培养基中长势则优于其他菌株。

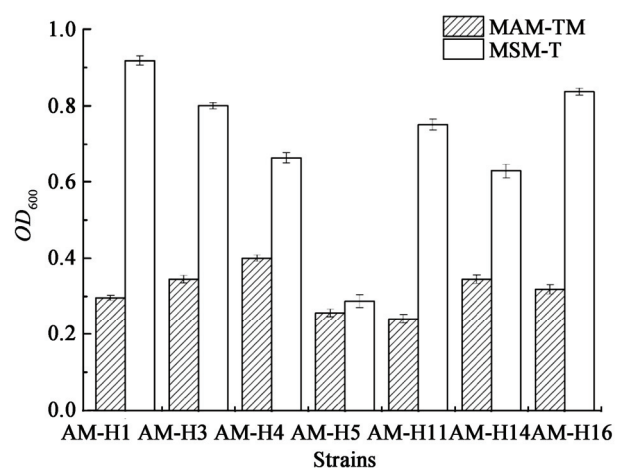


图 1 抗性菌株在 TMSM 和 MTMSM 中的生长情况  
Figure 1 Growth comparison of the mesotrione-resistant strains in MSM-MT and MSM-T

## 2.2 抗性菌株 16S rRNA 基因序列分析及系统进化树构建

经 PCR 扩增获得的 16S rRNA 基因序列长约 1 400 bp, 其 GenBank 登录号为 KP174137-KP174143, 筛选获得的抗性菌株可分成 3 类, 其中 AM-H1 属不动杆菌属 *Acinetobacter* sp., AM-H3 和 AM-H14 为无色杆菌属 *Achromobacter* sp., AM-H4、AM-H5、AM-H11 和 AM-H16 为假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.。选择抗性最佳的 AM-H4 作为下一步的研究对象, 将该菌株 16S rRNA 基因序列与已发表的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析, 选取同源性较高的多株细菌构建系统发育树(图 2), 结果表明菌株 AM-H4 与已报道的施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)模式菌株 ATCC17588 亲缘关系最近, 有 99.21%的相似性。

## 2.3 HHPD 基因序列的获得

在 GenBank 中寻找不同来源的 HHPD 进行 ClustalW 比对, 选择保守的 2 个区域, 设计简并引物进行 PCR 扩增获得了长度约为 500 bp 的核酸序列。经信息学比对分析, 所得序列与 *Acinetobacter*

*baumannii* 来源的 *hppd* 相似性达 99%。以 *Acinetobacter baumannii* 1656-2 的 *hppd* 基因序列设计上下游引物, 扩增得到全长为 1 056 bp 的序列, 编码 351 个氨基酸残基(GenBank 登录号为: KP174144), 该序列与 *Acinetobacter baumannii* 1656-2 的 HHPD 序列一致性达 99%, 其编码的氨基酸序列的第 341 位发生变异, 由天冬氨酸突变为丙氨酸(图 3)。

## 2.4 HPPD 的异源表达

表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 和阴性对照菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-29a(+), 经 1 mmol/L IPTG 诱导 12 h 后收集菌体, SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 4, *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 在分子量 40 kD 附近有明显的特异性条带, 与预期蛋白分子量大小一致, 表明来源于抗性菌株 AM-H4 的 HPPD 基因在大肠杆菌中实现异源表达。

## 2.5 HPPD 基因在大肠杆菌中的硝磺草酮抗性分析

大肠杆菌 BL21(DE)中存在酪氨酸氨基转移酶, 可催化酪氨酸生成对羟苯基丙酮酸(4-HPP), 作为

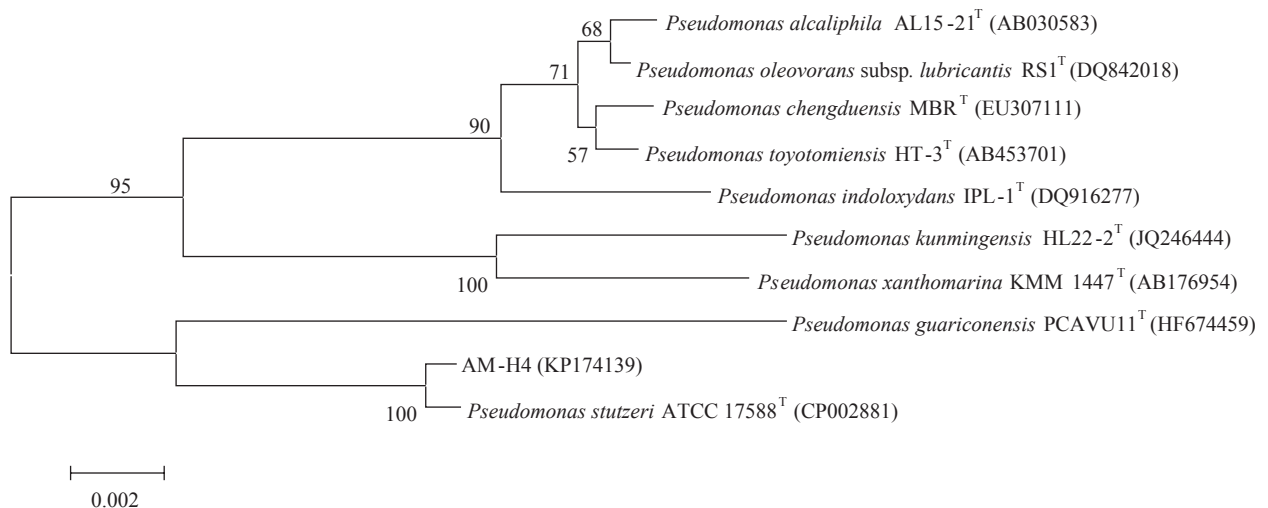


图 2 菌株 AM-H4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain AM-H4 and related species based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号中的序号代表序列在 GenBank 中的序列号; 节点上的数字表示 Bootstrap 值; 刻度 0.002 表示序列偏差值。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.002 represent sequence divergence.

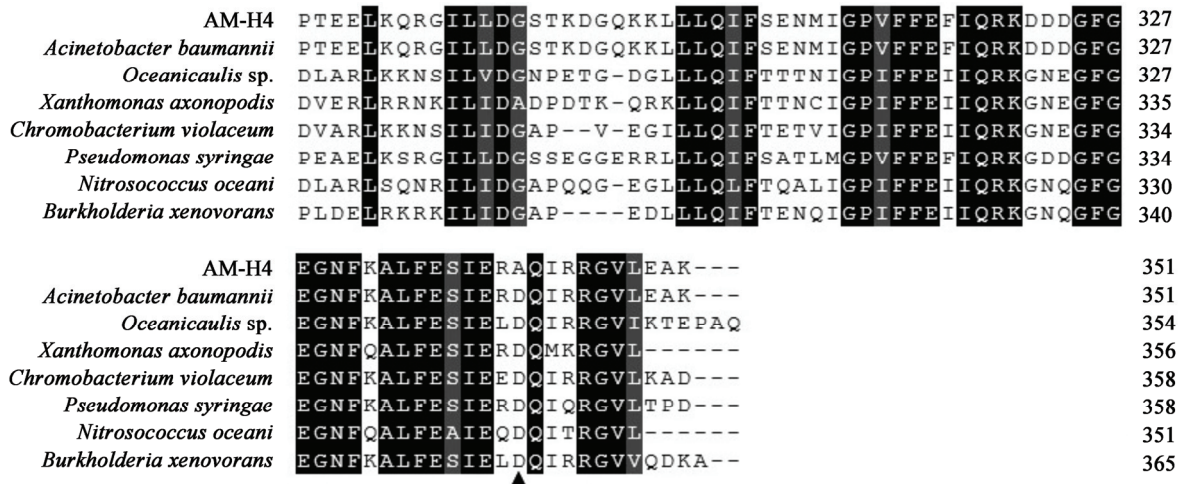


图3 HPPD C 端氨基酸序列的比对分析

Figure 3 Sequence alignment of the C terminal amino acid sequence cloned from the AM-H4 with those of other HPPD proteins

Note: GenBank accession number: *Acinetobacter baumannii* (WP\_000353163.1), *Oceanicaulis* sp. (EAP91524.1), *Xanthomonas axonopodis* (NP\_640807.1), *Chromobacterium violaceum* (NP\_900639), *Pseudomonas syringae* (WP\_010438666.1), *Nitrosococcus oceani* (YP\_343456.1) and *Burkholderia xenovorans* (YP\_560699).

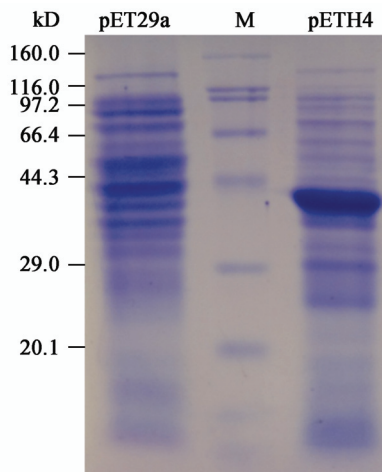


图4 HPPD 基因重组表达的 SDS-PAGE 检测  
Figure 4 SDS-PAGE analysis of HPPD expressed in *E. coli* BL21(DE3)

HPPD 的底物而被利用，生成的 HGA 进一步氧化和聚合后产生棕色物质，利用硝磺草酮存在条件下颜色的深浅作为 HPPD 活性的抑制指标<sup>[13]</sup>。将 *E. coli* BL21(DE3)-pET-29a(+)和 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 以 10%接种量接种至含 1 g/L 酪氨酸及不同浓度硝磺草酮的 LB 培养基中(200 μL)，培养 1 d 后，与空载相比，*E. coli* BL21(DE3)-pETH4 可观察到棕色物质产生(图 5)，且色素的产生随硝磺草酮浓度的增加而被抑制。*E. coli* BL21(DE3)-pETH4 的菌液离心后，监测上清 440 nm 处色素的吸收强度(图 6)，结果表明在 40 μmol/L 硝磺草酮的存在条件下，色素产生显著减少，该 HPPD 能够耐受高于 200 μmol/L 的硝磺草酮，其硝磺草酮抗性明显优于已报道的 HPPD。

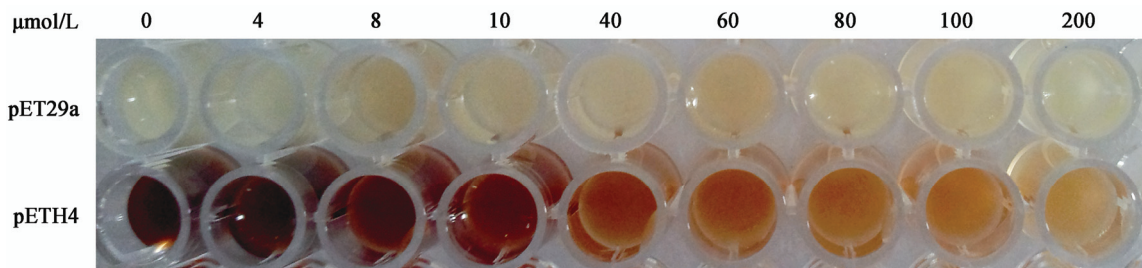


图5 硝磺草酮对 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 催化底物生成色素的抑制效果  
Figure 5 The inhibition effect by mesotrione on *E. coli* BL21(DE3)-pETH4

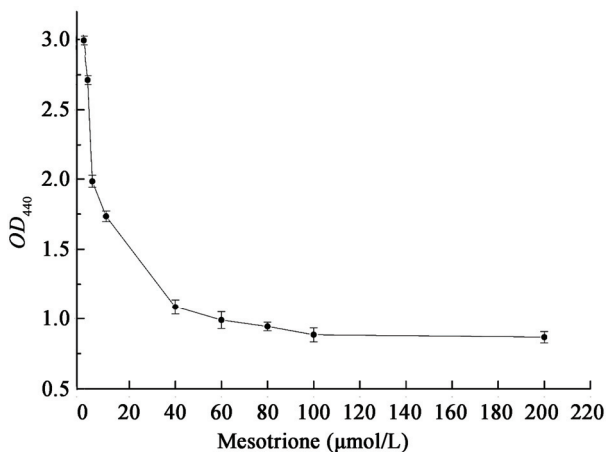


图 6 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 催化反应产物在  $\lambda_{440}$  处的吸收值

Figure 6 Absorbance at 440 nm of color pigments produced by *E. coli* BL21(DE3)-pETH4

### 3 结论

HPPD 抑制剂是控制玉米和水稻等重要作物杂草的一种新型白化型除草剂, HPPD 是目前抗性报道较少的农药靶标, 直至最近才报道了两种有关 HPPD 抑制剂的抗性杂草<sup>[15-17]</sup>, 包括 *Amaranthus tuberculatus* 和 *Amaranthus palmeri*。HPPD 抑制剂的除草剂特性引起了研究者们开发耐受 HPPD 抑制剂的转基因作物的兴趣<sup>[18-19]</sup>, 他们筛选并克隆了抑制剂抗性 HPPD 基因, 但耐受的浓度都不高, 影响其实际应用。如 Liang 等<sup>[20]</sup>于 2008 年首次从黄连 (*Coptis japonica*) 培养细胞中克隆表达了具有 HPPD 抑制剂抗性的 CjHPPD, DTP (吡啶类除草剂的活性形式) 和双环磺草酮(三酮类除草剂)对重组 CjHPPD 的  $IC_{50}$  分别为  $6.75 \mu\text{mol/L}$  和  $2.34 \mu\text{mol/L}$ 。Lee 等<sup>[21]</sup>报道从土壤宏基因组中筛选得到 mHPPD, 该 HPPD 能够耐受  $20 \mu\text{mol/L}$  磺草酮。本研究从不同来源的土壤样品中分离得到 7 株高抗硝磺草酮的菌株, 在  $10 \text{ mmol/L}$  硝磺草酮的条件下均可以利用酪氨酸进行生长, 从假单胞菌属 AM-H4 中克隆的重组 HPPD 可耐受高于  $200 \mu\text{mol/L}$  的硝磺草酮, 比以往报道的抗三酮类除草剂浓度高出很多。

野生型 HPPD 对除草剂的耐受性均较低, 可通

过氨基酸序列某些位点的突变而提高除草剂抗性。如 Sailland 等<sup>[22]</sup>将集胞藻属 HPPD 序列中的 Gly318 突变为 Asn 和 Ala, 突变体 SyN318 和 SyA318 的  $IC_{50}$  分别比野生型 HPPD 提高了 1 000 倍和 500 倍, 对底物 HPP 的亲合力则分别降低了 8 倍和 5 倍, 对 DKN (异恶唑草酮的活性形式) 的抗性显著提高。Boudec 等<sup>[23]</sup>则对荧光假单胞菌 HPPD 进行随机突变, 筛选得到能耐受  $7 \text{ mmol/L}$  异恶唑草酮的抗性 HPPD 突变体, 突变体序列分析表明其突变位点主要位于 HPPD 保守的 C-末端。Lee 等<sup>[24]</sup>和 Lin 等<sup>[25]</sup>的研究都表明 C 端序列在维持 HPPD 的构象和催化活性方面发挥重要作用。本研究从 AM-H4 中克隆得到的 HPPD 序列与 *Acinetobacter baumannii* 的 HPPD 基因序列同源性最高, 且该 HPPD 在 C 端 341 位发生突变的天冬氨酸, 在其他不同来源的 HPPD 序列中也是保守存在的(图 3), 因此推测位点 341 的变化可能是导致 AM-H4 菌株对硝磺草酮耐受性增强的原因之一。本研究今后将着重研究该 HPPD 基因对硝磺草酮的抗性机制, 通过定点突变筛选高抗性 HPPD, 为抗硝磺草酮转基因作物品种的选育提供新的基因资源。

### 参 考 文 献

- [1] Heap I. The International survey of herbicide resistant weeds[DB/OL]. <http://www.weedscience.org/summary/MOA.aspx?MOAID=12>, 2014
- [2] Duke SO. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?[J]. Pest Management Science, 2012, 68(4): 505-512
- [3] Beaudegnies R, Edmunds AJ, Fraser TE, et al. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors—a review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective[J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2009, 17(12): 4134-4152
- [4] Ahrens H, Lange G, Muller T, et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: solutions for modern and sustainable agriculture[J]. Angewandte Chemie-international Edition, 2013, 52(36): 9388-9398
- [5] Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TEM, et al. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize[J]. Pest Management Science, 2001, 57(2): 120-128
- [6] Liang YL, Yu JJ. Advances in a new target for bleaching-herbicide  $\beta$ -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and herbicide-resistant transgenic plants[J]. China Biotechnology, 2009, 29(12): 100-107 (in Chinese)
- 梁玉玲, 于静娟. 新型白化型除草剂靶标酶对羟苯基丙酮酸双加氧酶及其耐性转基因植物研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 100-107
- [7] APHIS. Petition (09-328-01p) for determination of

