微生物学通报 Microbiology China tongbao@im.ac.cn



Oct. 20, 2015, 42(10): 1895–1902 © 2015 by Institute of Microbiology, CAS DOI: 10.13344/j.microbiol.china.141023

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 HHPD 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 μmol/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 μmol/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 grew 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 μ mol/L mesotrione. In addition, the brown pigment was still visible when the concentration of mesotrione was greater than 200 μ 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^[1-2]。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^[3-4]。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)^[5], 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^[6]。 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^[7-8],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)^[9],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^[10]。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^[11-13],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侯选微生物及基因 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[™] 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 7.0,1×10⁵ 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, NH₄NO₃ 1.0, K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.1,加蒸馏水定容至1L,调pH 至7.0,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

酪氨酸母液(100 g/L):称取1g酪氨酸溶于 10 mL 2mol/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 ℃、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 ℃、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 ℃、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 ℃、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 ℃ 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^[14]进 行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 采用 20 µL 反 应体系: 10×Taq buffer 2.0 µL, 模板(40 mg/L) 0.5 μL, 27F (20 μmol/L) 1 μL, 1492R (20 μmol/L) 1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, Taq $matha{m}(5 \text{ U/μL})$ 0.2 μL, 加 ddH₂O 补至 20 μL。扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 33 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 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^[11]。

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.fhcrc.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 DH5α,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 HHPD 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 微生物学通报 Microbiol. China

	表1 引物序列	
Table 1 Sequence of primers		
引物	序列	
Primers	Sequence $(5' \rightarrow 3')$	
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	
CODEHOP-F	GCTTTGGCTTAACATATATTGATCATTTAacncayaaybt	
CODEHOP-R	TGCCTTTGCGTTGAATAATTtcraaraadat	
HPPD-F1	ATGGATATTTTAGAGAACCC	
HPPD-R1	TTATTTGCTTCGAGCAC	
HPPD-F2	GGAATTC <u>CATATG</u> GATATTTTAG ^a	
HPPD-R2	CCG <u>CTCGAG</u> TTTTGCTTC	

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 μL 无菌水重悬菌体,取 40 μL 菌体悬浮 液,加入 10 μL 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 μL),设置不同的硝 磺草酮浓度梯度,0、2、4、10、40、60、80、100、 200 μmol/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 μL 至 96 孔板,利用酶标仪测定 λ_{440} 处的吸收 值^[12]。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10mmol/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,扫谱结果显示硝 磺草酮(λ_{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 亲源
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.

http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn



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).





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^[13]。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。



Figure 5 The inhibition effect by mesotrione on *E. coli* BL21(DE3)-pETH4

http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn



图 6 *E. coli* BL21(DE3)-pETH4 催化反应产物在 λ₄₄₀ 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^[15-17],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^[18-19],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^[20]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 CiHPPD, DTP (吡唑类除草剂的活性 形式)和双环磺草酮(三酮类除草剂)对重组 CiHPPD 的 IC50 分别为 6.75 µmol/L 和 2.34 µmol/L。Lee 等[21] 报道从土壤宏基因组中筛选得到 mHPPD,该 HPPD 能够耐受 20 μmol/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 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 µmol/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^[22]将集胞藻属 HPPD 序列中的 Gly318 突变为 Asn 和 Ala, 突变体 SyN318 和 SyA318 的 IC50分别比野生型 HPPD 提高了 1 000 倍和 500 倍, 对底物 HPP 的亲和力则分别降低了 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^[23]则对荧光假单胞菌 HPPD 进行随机突 变,筛选得到能耐受 7 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^[24]和 Lin 等^[25] 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

- Heap I. The International survey of herbicide resistant weeds[DB/OL]. http://www.eedscienceorg/summary/MOAaspx? 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 Chemieinternational 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 β-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

non-regulated status of event FG72 soybean bayer cropscience LP and MS technologies LLC[J/OL]. http://www.aphis.usda. gov/brs/aphisdocs/09_32801p_fpra.pdf, 2009

- [8] APHIS. Revised petition (12-215-01p) for determination of non-regulated status for herbicide-tolerant event SYHT0H2 soybean syngenta seeds Inc and bayer cropscience AG[J/OL]. http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/12_21501p_Syngenta_ Submitted_ER.pdf, 2012
- [9] Matringe M, Sailland A, Pelissier B, et al. p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants[J]. Pest Management Science, 2005, 61(3): 269-276
- [10] Boudec P, Rodgers M, Dumas F, et al. Mutant hydroxyphenylpyruvate dioxygenase polypeptides and methods of use: US Patent Application, No 2010/0197503[P]. 2010
- [11] Xiao Y, Di P, Chen J, et al. Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (Smhppd) from Salvia miltiorrhiza hairy root cultures[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(7): 2019-2029
- [12] Lederer B, Boger P. Recombinant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase of high activity[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences, 2005, 60(7/8): 549-556
- [13] Frick E, Spatzal T, Gerhardt S, et al. Structural and functional characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the thermoacidophilic archaeon Picrophilus torridus[J]. Extremophiles, 2014, 18(4): 641-651
- [14] Zhang RF, Cao H, Cui ZL, et al. Extraction and purification of soil microbial total DNA[J]. Acta Micrbiologica Sinica, 2004, 43(2): 276-282 (in Chinese) 张瑞福,曹慧,崔中利,等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯 化[J]. 微生物学报, 2004, 43(2): 276-282
- [15] Ma R, Kaundun SS, Tranel PJ, et al. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp[J]. Plant Physiology, 2013, 163(1): 363-377
- [16] Hausman NE, Singh S, Tranel PJ, et al. Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States[J]. Pest Management Science, 2011, 67(3): 258-261
- [17] McMullan PM, Green JM. Identification of a tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype resistant to HPPD-inhibiting herbicides, atrazine, and thifensulfuron in Iowa[J]. Weed Technology, 2011, 25(3): 514-518
- [18] Siehl DL, Tao Y, Albert H, et al. Broad

4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette[J]. Plant Physiology, 2014, 166(3): 1162-1176

- [19] Dufourmantel N, Dubald M, Matringe M, et al. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(1): 118-133
- [20] Liang Y, Minami H, Sato F. Isolation of herbicide-resistant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured Coptis japonica cells[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72(11): 3059-3062
- [21] Lee CM, Yeo YS, Lee JH, et al. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 370(2): 322-326
- [22] Sailland A, Rolland A, Matringe M, et al. DNA sequence of a gene of hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase and which are tolerant to certain herbicides: United State, 6268549[P]. 1996, 12.01. http://patft.uspto.gov/netacgi/ nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u= %2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1= 6268549.PN.&OS=PN/6268549&RS=PN/6268549
- [23] Boudec P, Rodgers M, Dumas F, et al. Mutant hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such gene and which are tolerant to herbicides: United State, 6245968[P]. 2001, 06.12. http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HI TOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum. htm&r=1&f=G&l=50&s1=6245968.PN.&OS=PN/6245968&RS =PN/6245968
- [24] Lee MH, Zhang ZH, MacKinnon CH, et al. The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity[J]. FEBS Letters, 1996, 393(2/3): 269-272
- [25] Lin JF, Sheih YL, Chang TC, et al. The interactions in the carboxyl terminus of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase are critical to mediate the conformation of the final helix and the tail to shield the active site for catalysis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69733