

李凡,路史展,刘羽鑫,等.在质体中表达 EPSPS 赋予烟草草甘膦抗性[J].华中农业大学学报,2021,40(5):1-8.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.001

在质体中表达 EPSPS 赋予烟草草甘膦抗性

李凡¹,路史展¹,刘羽鑫¹,林拥军¹,吴高兵²,周菲¹

1.华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070; 2.华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070

摘要 在烟草质体中应用来源于玉米的复合型顺式表达元件驱动来源于 *Isoptericola variabilis* 的新型耐草甘膦 EPSPS 基因 *AroA_{I.vu}** 的表达,使其在叶片及非绿色组织中同时高效表达。对获得的同质化质体转化植株进行转录及蛋白水平分子检测,结果表明:*AroA_{I.vu}** 基因在转基因植株叶片及根部组织中均得到有效表达;达到同质化的烟草转基因植株 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 的 T₀ 代种子可耐受高于 12 mmol/L (2 000 mg/L) 的草甘膦处理,在温室中培养的转基因植株可耐受 1 800 mg/L 剂量的草甘膦喷施处理。野生型与转基因植株的正反交实验证实通过质体转化获得的草甘膦抗性转基因植株具有母系遗传的特点。

关键词 质体转化;烟草;*AroA_{I.vu}**;草甘膦;5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶;转基因;母系遗传

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0001-08

草甘膦又名 N-(磷酸甲基)甘氨酸,是一种内吸传导型广谱系统性除草剂,自 20 世纪 70 年代以来,已成为全世界使用最广泛的除草剂^[1]。5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase,EPSPS)是一种由核编码的叶绿体定位蛋白,它参与植物、微生物体内重要的莽草酸代谢途径,通过催化磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate,PEP)的烯醇丙酮酰基转移至莽草酸-3-磷酸(shikimate-3-phosphate,S3P)的 5-OH 处合成 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate,EPSP)^[2]。草甘膦不直接与游离的 EPSPS 酶结合^[3-4],而是形成 EPSPS-S3P-复合物,竞争性抑制 PEP 的结合^[5-6],阻断莽草酸途径,抑制下游芳香族氨基酸合成,从而导致蛋白合成受阻、次生代谢产物缺乏,最终造成植物死亡。研究表明,莽草酸途径具有低毒性,且在人和哺乳动物中尚未发现该途径,因此,认为草甘膦对人畜基本没有毒性^[7],是培育耐除草剂作物的优良靶标除草剂。

*AroA_{I.vu}** 基因是由华中农业大学生命科学技术学院刘子铎教授团队从放线菌属变异白蚁菌(*Isoptericola variabilis*)中鉴定到的一类非敏感型 EPSPS 合酶基因,并已申请了专利^[8]。与已报道的具备天然草甘膦抗性的 EPSPS 的序列相似性均小

于 30%,属于具有新型序列特征的 EPSPS,且酶动力学分析表明 *AroA_{I.vu}** 在对草甘膦具有耐受性的同时还保持了对底物 PEP 较强的亲和力^[9]。Cui 等^[10]将 *AroA_{I.vu}** 通过密码子优化人工合成后,利用遗传转化导入到水稻中,培育获得了农艺性状优良、具有商业应用潜力的高抗草甘膦的转基因水稻家系。*AroA_{I.vu}** 也在油菜中获得了转化,创制的转化体能耐受 4 倍田间推荐使用剂量的草甘膦^[11]。

基因漂移在自然界中是普遍现象,花粉介导的基因漂移引起花粉污染已被证实,转基因作物可能造成的基因漂移是目前公众对转基因生物安全担忧的问题之一,如抗草甘膦转基因植株与近源杂草或附近非转基因作物远交导致“超级杂草”的出现。由于质体转基因植株具有母系遗传的特点,将耐草甘膦基因转入作物质体中高效表达,培育抗除草剂转基因作物,无疑是一种良好的替代方案。在已有研究中,尝试将 *bar* 基因转入烟草质体中表达可以使转化植株获得草甘膦除草剂抗性^[12-13];Daniell 等^[14]将矮牵牛来源的 EPSPS 基因转入烟草质体中,转叶绿体基因植物能够耐受高达 5 mmol/L 草甘膦;Ye 等^[15]在烟草质体中分别过表达了原核生物(芽孢杆菌、无色杆菌和农杆菌)来源的 EPSPS 基因,其中转入 CP4 EPSPS 的家系叶片中 EPSPS 的

收稿日期:2021-05-18

基金项目:国家自然科学基金项目(31771752);中央高校基本科研业务费专项(2662019PY083)

李凡,E-mail:lifan@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:周菲,E-mail:zhoufei@mail.hzau.edu.cn

含量占可溶性总蛋白的 10%, 并具有高水平的草甘膦抗性。

本研究使用来源于 *I. variabilis* 的新型抗草甘膦基因 *AroA_{I.vu*}*^[8-11], 根据质体密码子偏爱性优化后, 利用 Zhang 等^[16]鉴定到的非绿色组织高效表达顺式元件驱动, 导入烟草质体中高效表达, 旨在为通过质体转化培育抗草甘膦烟草以及其他作物提供理论基础和可行性参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室进行。进行叶绿体遗传转化的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种为 Petit Havana。所用表达载体为烟草叶绿体转化载体 pJZ120^[12], 其玉米来源的 *ZmPrrn:PclpP:clpP* 顺式元件能够驱动外源基因在非绿色组织中高效表达, 以具有壮观霉素、链霉素抗性的 *aadA* 基因作为筛选标记, 烟草质体基因组插入位点为 *trnG* 和 *trnfM* 之间的基因间区。所用大肠杆菌菌株为 DH5 α 。

1.2 烟草叶绿体转化载体的构建及遗传转化

根据叶绿体密码子偏爱性对 *I. variabilis* *AroA* 基因进行密码子优化, 5'端和 3'端分别加入 *Nde* I 和 *Xba* I 酶切位点, 并去除基因内部常用酶切位点, 由金斯瑞公司进行基因合成, 获得载体 pAroA_{I.va*}。使用 *Nde* I 和 *Xba* I 双酶切 pAroA_{I.va*} 及中间载体 pZF4, 通过 T4 DNA 连接酶 (NEB) 将 *AroA_{I.vu*}* 基因连接到 pZF4 上, 获得具有 *AroA_{I.vu*}* 基因表达盒的载体 pAroA_{I.va*}-box。根据 pJZ120 载体酶切位点及 *AroA_{I.vu*}* 基因表达盒序列, 设计如下引物: pLSZ3-F (5'-TATTAATCTAC-CATGGTGCATATGACTCCTGCTCCTGCTTC-3') 和 pLSZ3-R (5'-GTCGACGGTATCGATA-AGCTTGCTAGATTTTGTATTTCAA ATCT-TG-3'), 其中下划线的序列分别为 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点及 Gibson 法组装所需同源区段。使用 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切 pJZ120 载体使其线性化; 以载体 pAroA_{I.va*}-box 为模板, 使用 KOD FX (Toyobo) 进行 PCR 扩增, 程序为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 56 °C 30 s, 68 °C 100 s, 扩增 32 个循环。使用 DNA 纯化回收试剂盒 (Tiangen) 分别将酶切产物以及 PCR 产物纯化, 再使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme) 进行连接反应, 重组质粒经双

酶切及测序验证正确后将其命名为 pLSZ3, 转入 DH5 α 大肠杆菌中, 使用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 抽提高浓度质粒, 用无菌 ddH₂O 溶解后将浓度调整至 2 000 ng/L。

参照 Svab 等^[17]的方法通过基因枪介导的质体转化技术获得质体转基因烟草, 经过多轮筛选后将再生幼苗放入生根培养基中, 待其长出完整根系后进行炼苗, 随后移栽至营养土中, 最终获得转基因烟草植株 T₀代种子。

1.3 转基因烟草的同质化检测

T₀代转基因植株移栽 2 周后长出新叶片。取烟草转化植株幼嫩叶片, 使用 CTAB 法分离、纯化烟草基因组 DNA, 使用限制性内切酶 *Bgl* II 将 8 μ g 基因组 DNA 消化完全。通过琼脂糖凝胶电泳分离大小不同的 DNA 片段, 变性后转移到尼龙膜上。与经 DIG-11-dUTP 标记的特异性探针 DIG-*psaB* 杂交后, 使用偶联碱性磷酸酶的地高辛抗体检测标记探针, 最后利用碱性磷酸酶的化学发光底物产生可见光, 并使用 X 射线胶片记录, 从而检测特定 DNA 分子含量, 验证烟草转化植株是否同质化。

取阳性转化烟草 T₀代种子, 依次使用 75% 乙醇和 6% 次氯酸钠 (沪试) 消毒后, 用无菌蒸馏水清洗 5 次, 接种到含有 500 mg/L 壮观霉素的 RM 培养基上培养 15 d, 观察统计绿苗率。

1.4 转基因烟草基因表达量检测

取烟草转化植株, 使用异硫氰酸胍法分别提取叶片和根部组织的总 RNA。通过甲醛变性凝胶电泳分离后, 转移到尼龙膜上。经 DIG-11-dUTP 标记的特异性探针 DIG-*AroA_{I.vu*}* 杂交后, 使用偶联碱性磷酸酶的地高辛抗体检测标记探针, 最后利用碱性磷酸酶的化学发光底物产生可见光, 并使用 X 射线胶片记录, 从而检测 *AroA_{I.vu*}* 基因表达量。

取 500 ng 叶片和根部组织的总 RNA, 使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme) 进行逆转录合成 cDNA。根据目的基因 *AroA_{I.vu*}* 和烟草内参基因 *ef1 α* (elongation factor 1- α) 序列, 设计 RT-PCR 引物: *AroA_{I.va*}*-RT-F (5'-GCTTCTCCTGATGCTACTTCTCC-3'), *AroA_{I.va*}*-RT-R (5'-TCAACATCAACAGCACCTCCTC-3'), *ef1 α* -RT-F (5'-GCTGACTGTGCTGTCCTGAT-3'), *ef1 α* -RT-R (5'-CTTGTCTGAGGGCCTCTTGG-3')。以逆转录合成的 cDNA 为模板, 使用 *rTaq* 酶 (TAKARA) 分别扩增 *AroA_{I.vu*}* 和 *NtEf1 α* 基因片段。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C

30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s; 28 个循环。

取烟草转化植株叶片和根部组织,在液氮中充分研磨后使用蛋白抽提液提取总蛋白,并使用 BCA 法测定蛋白浓度。取 5 μ g 总蛋白样品,变性后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,使用半干转移法将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭后用一抗和二抗对膜进行免疫反应,最后经过底物显色检测特异性目的基因表达的蛋白成分。

1.5 转基因烟草草甘膦抗性检测

取消毒后的烟草转化植株 T₀ 代种子,均匀接种到含草甘膦的 RM 培养基,在光照培养室培养 15 d 后,拍照记录幼苗根部,使用 Image J 软件(<https://imagej.nih.gov/ij/>)对照片中根部长度进行测量记录。

取 4 叶期烟草阳性植株无菌苗,将叶片切成 5 mm×5 mm 大小,根部切成 1 cm 长的小段,分别放置于含有 50 mg/L 草甘膦的 RMOP 培养基上,

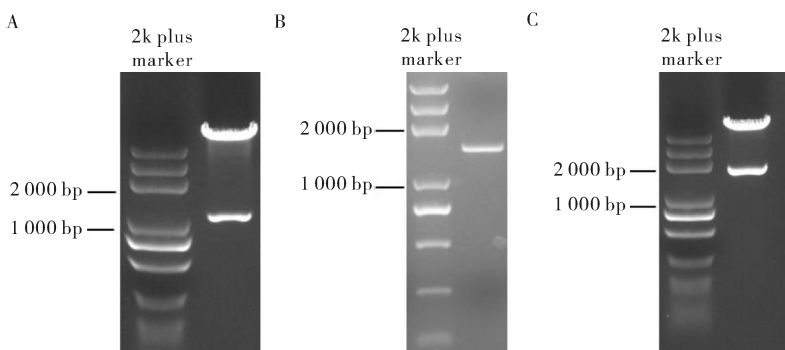
在光培室中培养 30 d,观察并记录叶片或根部分化及再生情况。

将 41% 草甘膦异丙胺盐(Roundup, Monsanto Company, USA)配制成 900、1 800、4 500 mg/L 的草甘膦溶液,在温室中分别均匀喷洒于 4 叶期烟草阳性转化植株叶面,并在喷洒后 30 d 记录烟草植株的生长状况。

2 结果与分析

2.1 烟草质体转化载体构建

基因表达盒 PCR 扩增产物和 pJZ120 载体酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到预期的条带(图 1A、B)。切下所需条带后使用胶回收试剂盒纯化,再根据一步法连接试剂盒说明书进行连接反应,重组质粒经酶切及测序验证(图 1C)后,转入大肠杆菌进行大量质粒抽提,并将质量浓度调整至 2 000 ng/ μ L 待用。



A: pJZ120 载体的线性化; B: *AroA_{1.200}* 片段的 PCR 扩增; C: 重组质粒的酶切验证。A: Linearization of pJZ120; B: PCR amplification of *AroA_{1.200}* fragment; C: Enzyme digestion verification of recombinant plasmid.

图 1 质体转化载体的构建

Fig.1 Vector construction of plastid transformation

2.2 烟草叶绿体遗传转化

取 4 叶期烟草无菌苗幼嫩叶片(共 7 片)平铺在 RMOP 培养基上,通过基因枪技术将携带有 pLSZ3 质粒 DNA 的金微粒分 7 次轰击进入叶片中,轰击后将叶片切成 5 mm×5 mm 大小,转入含有 500 mg/L 壮观霉素的 RMOP 培养基上初筛,待再生出幼芽后,取其叶片切成 3 mm×3 mm 大小,分别转入只含有壮观霉素及同时含有壮观霉素和链霉素的 RMOP 培养基,记作第 1 轮筛选,若在含有 2 种抗生素的培养基上可以分化出绿色愈伤,则表明此转化事件为阳性,而非自发突变(图 2);继续取只含有壮观霉素的培养基上幼芽叶片进行第 2 轮筛选。取出第 2 轮筛选中长出的幼芽,转入含有草甘膦的生

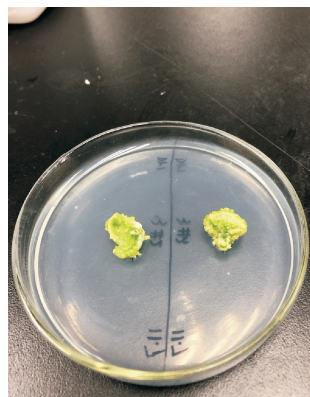


图 2 第 1 轮筛选中双抗培养皿上愈伤生长状况
Fig.2 Growth condition of callus on medium containing spectinomycin and streptomycin in first section

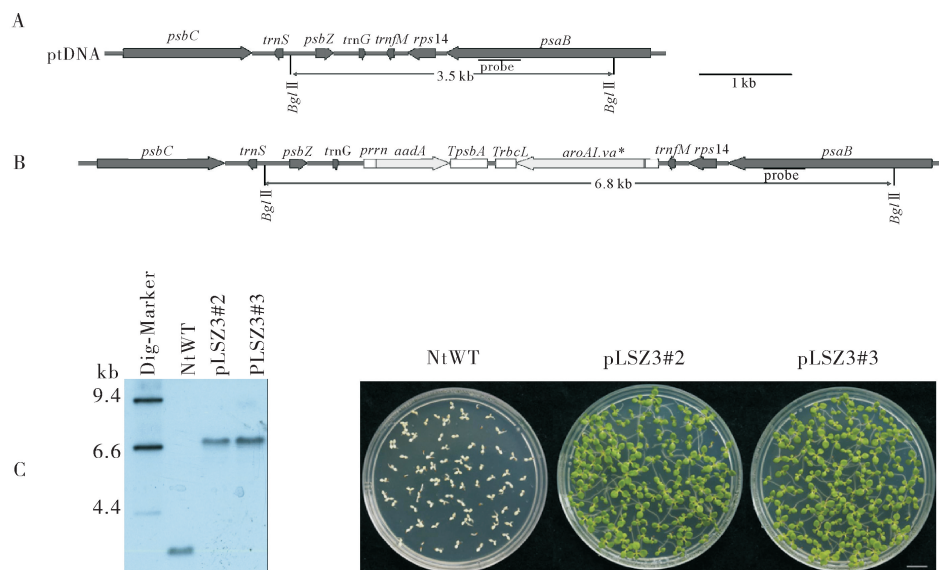
根培养基中生根培养,待根系充分形成且植株长大后进行炼苗移栽,成熟后收取转基因植株的 T_0 代种子。最终,利用质体转化技术,获得了 3 个在双抗 RMOP 培养基上分化出绿色愈伤的阳性转化事件,并选择 pLSZ3 #2、pLSZ3 #3 质体转化家系进行后续实验。

2.3 转基因烟草同质化检测

利用基因枪转化将 pLSZ3 质粒转入烟草质体中,通过载体两端的同源重组序列能够保证目的基因组插入位点在 *trnG* 和 *trnFM* 之间的基因间区,根据预测利用 *Bgl* II 酶切后跑胶,用 *psaB* 探针在野生型基因组中杂交条带大小应为 3.5 kb,同源重组后转基因植株基因组中杂交条带大小应为 7 kb(图

3A)。由 Southern 杂交结果可见,野生型烟草中杂交条带为 3.5 kb,阳性转基因烟草植株 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 中杂交条带为 7 kb,且未见野生型条带,故可判断所获 2 株阳性转基因烟草 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 中目的基因已定点插入到质体基因组中,并且达到同质化(图 3B)。

种子发芽试验结果显示,烟草种子在含有 500 mg/L 壮观霉素的生根培养基上培育 15 d 后,野生型烟草无抗性,表现为发育不正常的白色幼苗,而 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 植株的 T_0 代种子在培养基中全部正常发育,未见白色幼苗发生,进一步验证所获 2 株阳性转基因烟草 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 已达到同质化(图 3C)。



A:质体基因组中靶向区域的物理图谱。转基因靶向 *trnFM* 和 *trnG* 之间的基因间区; B:质体转基因烟草品系的 Southern 杂交分析。用 *Bgl* II 消化总 DNA,并与地高辛标记探针杂交,以检测质体基因组中转基因插入位点的区域,杂交信号表明质体转基因烟草品系已达到同质化; C:质体转基因品系 pLSZ3 #2 和 pLSZ3 #3 和野生型(WT) T_0 代种子,在含有 500 mg/L 壮观霉素的 RM 培养基上生长 2 周后的幼苗。标尺为 1 cm。A:Physical map of the targeting region in the plastid genome. The transgenes are targeted to the intergenic region between *trnFM* and *trnG*; B:Southern blotting of transplastomic lines. Total DNA was digested with *Bgl* II and hybridized to a radiolabeled probe detecting the region of the plastid genome that flanks the transgene insertion site. Hybridization signal indicates homoplasmism of all transplastomic lines; C:Seedlings after 2 weeks of growth on RM medium containing 500 mg/L spectinomycin. Transplastomic lines and wild-type plants (WT) were compared. Scale bar=1 cm.

图 3 烟草质体转基因植株同质化检测

Fig.3 Homoplasmic detection of transplastomic tobacco lines

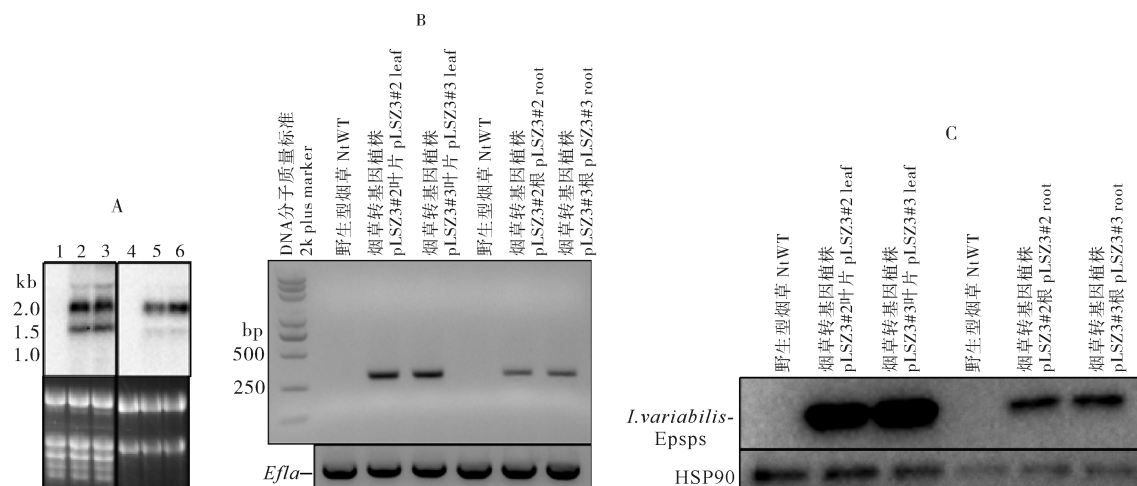
2.4 转基因烟草基因表达量检测

分别提取 5 叶期转基因烟草植株叶片和根部组织的总 RNA 和总蛋白,进行基因表达量检测。Northern 杂交(图 4A)及 RT-PCR(图 4B)结果均显示抗草甘膦 *AroA*_{Lva*} 基因在转录水平上得到有效表达,在根部组织表达量低于叶片中。Western 杂交分析(图 4C)检测结果显示蛋白在叶片和根部组

织中均有较高累积。

2.5 转基因烟草草甘膦抗性检测

为了检测质体转化植株 pLSZ3 #2、pLSZ3 #3 对于草甘膦的耐受性,取转基因烟草 T_0 代种子,消毒后分别接种到含有不同质量浓度的草甘膦的 RM 发芽培养基上培养 2 周后进行抗性观察。结果表明,野生型烟草种子在含 50 mg/L 草甘膦培养基



1.野生型烟草;2.烟草转基因植株 pLSZ3#2 叶片;3.烟草转基因植株 pLSZ3#3 叶片;4.野生型烟草;5.烟草转基因植株 pLSZ3#2 根;6.烟草转基因植株 pLSZ3#3 根。A:Northern 杂交分析叶片以及根部组织中 *AroA_{I. variabilis}* 基因 mRNA 表达水平。左侧为 RNA 分子质量标准,溴化乙锭染色的凝胶显示在每个印迹下方;B:以总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,RT-PCR 分析叶片以及根部组织中 *AroA_{I. variabilis}* 基因 mRNA 表达水平。DNA 分子质量标准在左侧给出,烟草内源基因 *Eflα* 作为参照在下方给出;C:Western 杂交分析叶片以及根部组织中 *I. variabilis* EPSPS 积累水平,烟草内源蛋白 HSP90 作为参照在下方给出。A:Northern blot analysis of *AroA_{I. variabilis}* mRNA expression in leaves and roots.1.NtWT; 2.pLSZ3#2 leaf; 3.pLSZ3#3 leaf; 4.NtWT; 5.pLSZ3#2 root; 6.pLSZ3#3 root. The band sizes of the RNA marker are given on the left. The ethidium bromide-stained gels are shown below each blot; B:RT-PCR analysis of *AroA_{I. variabilis}* mRNA expression in leaves and roots using cDNA obtained by reverse transcription of the total RNA. The band sizes of the DNA marker are given on the left. The band of tobacco endogenous *Eflα* gene is given below as a reference; C:Western blot analysis of *I. variabilis* EPSPS protein accumulation in leaves and roots using an anti-EPSPS antibody. The band of tobacco endogenous HSP90 protein is shown below the protein blot as a control.

图4 质体转基因植株的转基因表达水平测定

Fig.4 Determination of transgene expression levels in transplastomic plants

上叶片完全不能萌发,pLSZ3 质体转化植株为正常绿色幼苗。取在含有草甘膦 RM 培养基上萌发的幼苗,拍照并测量幼苗根部生长状况。结果显示,pLSZ3 质体转化植株根部生长未受到明显抑制,表明在非绿色组织高效顺式元件驱动下,*AroA_{I. variabilis}* 基因在根部组织中获得了高水平表达(图 5A、B)。结果进一步显示,pLSZ3 的后代能够在含有 12 mmol/L(2 000 mg/L)和 15 mmol/L(2 500 mg/L)草甘膦培养基上萌发(图 5C)。

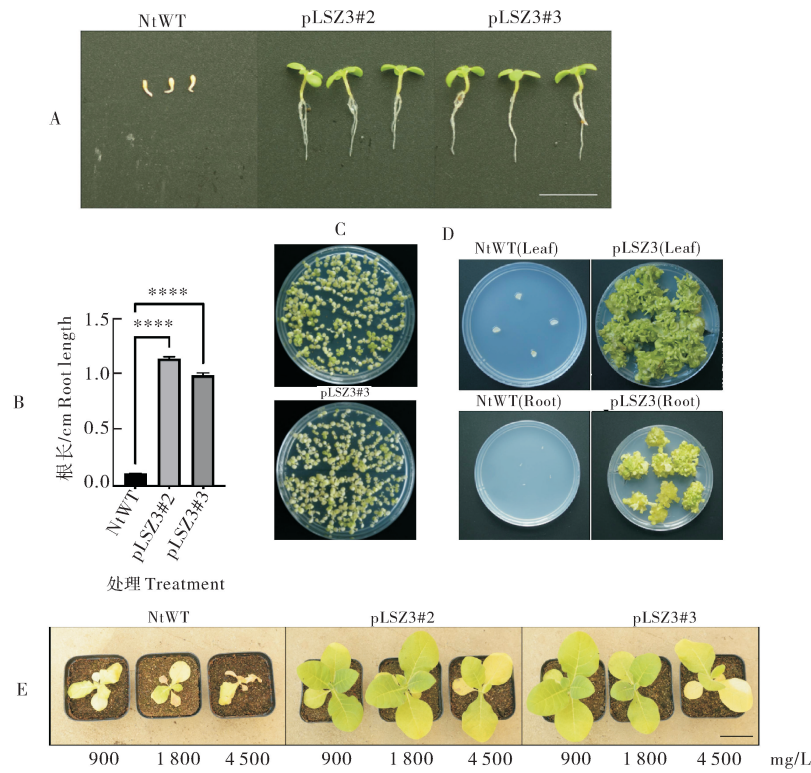
取叶片和根部组织在含有草甘膦的 RMOP 中均能形成绿色愈伤组织并再生幼芽,但根部组织幼芽再生较慢,且部分会分化出无再生能力的非胚性愈伤,可能是由于 *AroA_{I. variabilis}* 基因在根部表达弱于叶片组织(图 5D)。

让转基因烟草在温室中生长 1 个月,并喷洒不同剂量的草甘膦溶液。结果显示,野生型在喷洒 7 d 后整个叶片表面和茎尖分生组织萎缩并表现出不同

程度的除草剂破坏症状。而 pLSZ3 质体转基因家系均可耐受 900 mg/L 和 1 800 mg/L 的剂量,当草甘膦施加量达 4 500 mg/L 时,除了植株底部老叶表现出明显黄化外,其余组织未发生草甘膦为害症状(图 5E)。

2.6 草甘膦抗性的母系遗传

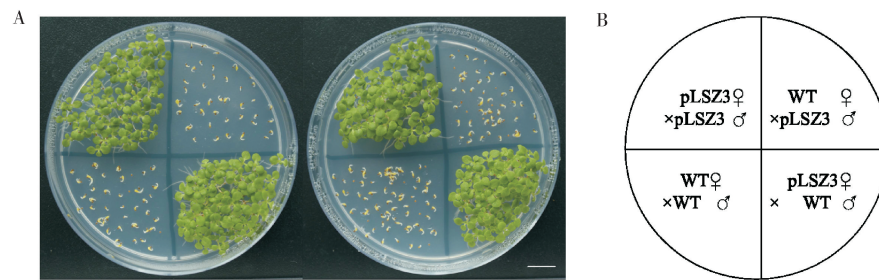
质体遗传信息遵循母系遗传的特点,能够避免转基因植株花粉漂移造成的安全性问题。将抗草甘膦质体转化植株与野生型烟草进行正反交及自交实验,取 50~100 粒后代种子消毒后放置在含有 50 mg/L 草甘膦的 RM 培养基上萌发 15 d。只有以质体转化烟草为母本时,草甘膦抗性才能遗传给后代,表现为正常绿色幼苗;其余条件后代未获得草甘膦抗性性状,无法正常生长(图 6A)。与预期结果相同,说明质体转化植株遵循严格的母系遗传,通过质体转化培育抗除草剂作物品种在生物安全性上具有明显的优势。



A:在含有 50 mg/L 草甘膦的培养基上生长 2 周后的幼苗。标尺为 1 cm。B:通过图像定量分析根部生长($n=3$)。标尺为 1 cm。C:在含有 12 mmol/L 和 15 mmol/L 草甘膦的培养基上生长 2 周后的 pLSZ3 T₁代植株。D:将叶片和根外植体放置于含草甘膦(50 mg/L)的再生培养基中分析抗性。标尺为 1 cm。E:施用草甘膦后质体转化植株的生长状况。标尺为 5 cm。A:Seedlings after 2 weeks of growth on medium containing 50 mg/L glyphosate. B:Resistance was analyzed by exposure of leaf and root explants to glyphosate-containing regeneration medium (50 mg/L). Scale bar=1 cm. C: T₁ pLSZ3 seedlings after 2 weeks of growth on medium containing 12 mmol/L and 15 mmol/L glyphosate. Scale bar=1 cm. D:Quantification of root growth by image analysis. The values shown represent the length of the primary root, and are means + standard deviation ($n=3$). Scale bar=1 cm. E:Growth condition of transplastomic line after glyphosate application. The dose of glyphosate application is shown below the photos. Scale bar=5 cm.

图 5 质体转化植株的草甘膦抗性检测

Fig.5 Determination of glyphosate-resistance in transplastomic plants



A:质体转化家系 pLSZ3 # 2(左)、pLSZ3 # 3(右)与野生型进行杂交或自交,后代种子在含有 50 mg/L 的 RM 培养基上发芽,抗性幼苗均为绿色,而敏感幼苗则被漂白;B:种子在培养基上的分布。A:The transplastomic line (pLSZ3 # 2(left), pLSZ3 # 3(right)) self-crosses or crosses with wild type. Next generation seeds were germinated on medium containing 50 mg/L glyphosate. Note that resistant seedlings are uniformly green whereas sensitive seedlings are bleached; B:Distribution of seeds on culture medium.

图 6 质体转化植株中 *AroA*_{I.vat*} 基因的母系遗传

Fig.6 Maternal inheritance of the *AroA*_{I.vat*} transgene in transplastomic line

3 讨论

研究发现自然界中存在一些对草甘膦不敏感的 EPSPS,根据 EPSPS 的序列特征以及对草甘膦的敏感度,可将其大致分为 I 型和 II 型。I 型对草甘膦敏感,包含绝大多数植物、微生物来源的 EPSPS。而 II 型对草甘膦不敏感,与 I 型序列差异较大,其中来源于 *Agrobacterium* sp. CP4 的 EPSPS 基因已被用于商业化生产。除此之外,近年来还发现了许多不属于 I 型和 II 型的新型抗草甘膦基因,如 Yan 等^[18]将来源于 *Pseudomonas putida* 4G-1 的 EPSPS 基因转入烟草中,过表达 *PpAroA1* 基因的转基因烟草表现出对草甘膦的高耐受性,这表明新型的 *PpAroA1* 是今后培育具有草甘膦耐受性的转基因作物中的一种新的优良候选基因;Cui 等^[10]将来源于 *Isoptericola variabilis* 的 EPSPS 基因 *AroA* 转入水稻中,培育出了具有自主知识产权和商业化的抗草甘膦水稻新品种。尽管目前发现的抗草甘膦 EPSPS 种类较多,但用于商业化生产的只有 CP4 EPSPS 和 TIPS EPSPS,因此,鉴定具有新型高水平的草甘膦耐受性的 EPSPS 对于培育草甘膦耐受性的转基因作物具有重大意义。

叶绿体转化是植物基因工程中的一项新兴技术,其优势也逐渐被人们认识。Cui 等^[10]通过核转化将 *AroA_{L-coi}* 转入梗稻品种中花 11 中,在获得的单拷贝株系中有 50% 的株系在 180 mg/L 草甘膦培养基上生长受到抑制。而本研究利用叶绿体转化获得的转基因烟草可在 12 mmol/L (2 000 mg/L) 的培养基上生长(图 5C),耐受性提高了近 20 倍,表明叶绿体转化在提高外源基因表达量上相比核转化具有显著优势。另一方面,在核转化中由于 T-DNA 的随机插入有可能产生的位置效应和基因沉默现象,在创建转基因育种材料时,通常需要获得大量的转化体,并鉴定单拷贝转化株系中 T-DNA 插入位点,寻找插入基因间区的转化事件,工作量大且繁琐。叶绿体转化则通过同源重组机制能够将目的基因定点插入,获得的转基因家系的分子特征是一致的,相互之间不会因为位置效应影响目的基因的表达效率,故在叶绿体转化中所需的转基因事件数量少,工作量相对简单易行。本研究通过转化载体中的同源臂将目的基因定点插入到 *trnFM* 和 *trnG* 之间,并利用 Southern 杂交进行了验证(图 3B)。

草甘膦具有强烈的内吸传导性,能转移至植物各个器官组织中,但绝大部分叶绿体基因在非绿色

组织中会显著下调。番茄果实的有色体和马铃薯块茎中淀粉体转录和翻译的全基因组分析显示质体基因组在非绿色组织中有明显的下调表达^[19-20]。Li 等^[21]发现以 *Prn* 启动子驱动的外源基因转入质体后在根部组织中表达水平大幅降低。*aacD* 和 *clpP* 基因是目前发现的能在非绿色组织中上调表达的基因。本研究中驱动草甘膦为玉米来源的 *ZmPrn*:*PclpP*:*clpP* 组合顺式元件^[16],在质体转基因植株根部组织中能检测到基因的高效表达:根部组织在含有草甘膦的 RMOP 培养基上能正常分化出愈伤并再生幼芽;在含有生根培养基上萌发幼苗根部组织能正常伸长(图 5D)。因此,高耐受性草甘膦基因配合非绿色组织表达调控元件在培育草甘膦高抗性质体转化植株上具有更大的应用前景。本研究筛选出的新型抗广谱性除草剂草甘膦转基因烟草株系,也将为我国抗除草剂转基因烟草品种培育提供优异的种质资源。

参考文献 References

- [1] DUKE S O, POWLESS B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide[J]. Pest Manag Sci, 2008, 64(4): 319-325.
- [2] STEINRÜCKEN H C, AMRHEIN N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1980, 94(4): 1207-1212.
- [3] ANDERSON K S, SIKORSKI J A, JOHNSON K A. Evaluation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase substrate and inhibitor binding by stopped-flow and equilibrium fluorescence measurements[J]. Biochemistry, 1988, 27: 1604-1610.
- [4] PADGETTE S R, HUYN Q K, AYKEN S, et al. Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis[J]. J Biol Chem, 1988, 263: 1798-1802.
- [5] FRANZ J E, SIKORSKI J A, MAO M K. Glyphosate: a unique global herbicide[M]. Washington: American Chemical Society, 1997: 521-615.
- [6] GRUYS K J, WALKER M C, SIKORSKI J A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *E. coli*[J]. Biochemistry, 1992, 31: 5534-5544.
- [7] KEELING P J, PALMER J D, DONALD G K, et al. Shikimate pathway in apicomplexan parasites[J]. Nature, 1999, 397: 219-220.
- [8] 刘子铎, 易沐远, 林拥军, 等. 一种分离的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因: CN201410108595.2[P]. 2016-02-03. LIU Z D, YI M Y, LIN Y J, et al. An isolated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene: CN201410108595.2[P]. 2016-02-03 (in Chinese).

- [9] 易沐远. 新型草甘膦耐受性 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因的克隆、纯化与鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004. YI M Y. Cloning, purification and characterization of new types of gene encoding glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [10] CUI Y, HUANG S Q, LIU Z D, et al. Development of novel glyphosate-tolerant *Japonica* rice lines: a step toward commercial release[J/OL]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1218[2021-05-08]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01218>.
- [11] LI J H, DUAN Q, SHI M T, et al. Development and identification of transgenic rapeseed with a novel gene for glyphosate resistance[J]. Acta agronomica sinica, 2021, 47(5): 789-798.
- [12] LUTZ K A, KNAPP J E, MALIGA P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance[J]. Plant Physiol, 2001, 125(4): 1585-1590.
- [13] KANG T J, SEO J E, LOCN H, et al. Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the bar gene[J]. Mol Cells, 2003, 16(1): 60-66.
- [14] DANIELL H, DATTA R, VARMA S, et al. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(4): 345-348.
- [15] YE G N, HAJDUKIEWICZ P T, BROYLES D, et al. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco[J]. Plant J, 2001, 25(3): 261-270.
- [16] ZHANG J, RUF S, HASSE C, et al. Identification of *cis*-elements conferring high levels of gene expression in non-green plastids[J]. Plant J, 2012, 72(1): 115-128.
- [17] SVAB Z, MALIGA P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene[J]. PNAS, 1993, 90: 913-917.
- [18] YAN H Q, CHANG S H, TIAN Z X, et al. Novel *AroA* from *Pseudomonas putida* confers tobacco plant with high tolerance to glyphosate[J/OL]. PLoS One, 2011, 6(5): e19732[2021-05-18]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019732>.
- [19] KAHLAU S, BOCK R. Plastid transcriptomics and translationalomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein[J]. Plant cell, 2008, 20: 856-874.
- [20] VALKOV V T, SCOTTI N, KAHLAU S, et al. Genome-wide analysis of plastid gene expression in potato leaf chloroplasts and tuber amyloplasts: transcriptional and post transcriptional control[J]. Plant Physiol, 2009, 150: 2030-2044.
- [21] LI Y M, WANG R, HU Z L, et al. Expression of a codon-optimized *dsdA* gene in tobacco plastids and rice nucleus confers D-serine tolerance[J/OL]. Front Plant Sci, 2016, 7: 640[2021-05-18]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00640>.

Expression of an novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes (EPSPS) in plastids conferring glyphosate resistance in tobacco

LI Fan¹, LU Shizhan¹, LIU Yuxin¹, LIN Yongjun¹, WU Gaobing², ZHOU Fei¹

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A novel glyphosate-tolerant EPSPS gene *AroA*_{I.vu*} derived from *Isoptericola variabilis* and driven by maize-derived composite *cis*-element was efficiently and simultaneously expressed in the plastids of leaves and non-green tissues of tobacco. The results of transcription and protein-level determination of the homoplastomic transplastomic lines showed that the *AroA*_{I.vu*} gene was effectively expressed in the leaf and root tissues. The T₀ seeds of homoplastomic transplastomic plants pLSZ3#2 and pLSZ3#3 tolerated more than 12 mmol/L glyphosate treatment. The transgenic plants cultivated in the greenhouse tolerated the spraying treatment with glyphosate at a dose of 1 800 mg/L. Reciprocal crosses between wild-type and transgenic plants confirmed that the glyphosate-resistant transgenic plants obtained by plastid transformation had the characteristics of maternal inheritance.

Keywords plastid transformation; tobacco; *AroA*_{I.vu*}; glyphosate; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS); transgene; maternal inheritance

(责任编辑: 张志钰)