

丁宁,何云浩,吴琳绯,等.源于*Halomonas* sp.抗草甘膦EPSPS的克隆、鉴定及应用[J].华中农业大学学报,2024,43(3):158-166.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.03.016

源于*Halomonas* sp.抗草甘膦EPSPS的克隆、 鉴定及应用

丁宁¹,何云浩¹,吴琳绯²,李婵娟^{2,3},吴高兵¹

1. 华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070; 2. 武汉设计工程学院食品与生物科技学院,武汉 430205;
3. 华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

摘要 为培育高抗草甘膦作物以应对草甘膦杂草进化,从海洋细菌中筛选到1株高抗草甘膦的盐单胞菌属菌株(*Halomonas* sp.),通过基因组测序及生物信息学分析,确定该菌株的EPSPS基因,在*Escherichia coli*(DE3)中对fHoEPSPS、mfHoEPSPS(G384A位点突变)和mHoEPSPS(mfHoEPSPS N端缺失PDT)进行重组表达和纯化,并运用自切割肽LP4/2A介导的基因聚合策略,将抗草铵膦的酶(Repat)置于mHoEPSPS的N端,构建了双抗草甘/铵膦酶(RLH),将其编码基因导入烟草后赋予草甘/铵膦复合抗性。结果显示,该菌株的EPSPS基因(fHoEPSPS)可编码一个N段融合了预苯酸脱水酶(PDT)的双功能酶。草甘膦抗性分析显示mfHoEPSPS的抗性比fHoEPSPS提高了19倍,将mHoEPSPS基因导入烟草后可赋予烟草3倍推荐剂量的草甘膦耐受性,转RLH基因的烟草能够耐受3~5倍推荐剂量的草甘/铵膦复合除草剂。结果表明,源于*Halomonas* sp.的抗草甘膦EPSPS是一种新型草甘膦耐受酶,通过G384A的位点突变可提高酶活;利用自切割肽介导的基因堆叠策略获得的转RLH基因烟草表现出较高草甘/铵膦复合抗性。

关键词 抗除草剂作物;抗草甘膦5-烯醇式莽草酸-3-磷酸合成酶;草铵膦乙酰转移酶;双抗除草剂作物;
基因聚合

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2024)03-0158-09

草甘膦和草铵膦是全球广泛使用的2种灭生性除草剂,具有高效、低毒、广谱等优点。前者通过竞争性抑制植物莽草酸途径关键酶5-烯醇式莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS;EC 2.5.1.19),导致植物芳香族氨基酸合成受阻而死亡^[1];后者通过抑制谷氨酰胺合成酶(GS;EC 6.3.1.2)活性,导致植物氨同化受阻而死亡^[2]。灭生性的特点制约了这2种优良除草剂在农作物中的直接应用,然而通过转基因等现代生物育种手段,培育耐除草剂作物新品种,可以有效地解决这一问题。

全球超过20 a的产业化实践充分证明,耐除草剂(herbicide tolerant, HT)作物对于农业节能减排、增产增收、环境保护均具有重要的贡献^[3-5]。近年来,我国进行的转基因玉米大豆产业化试点研究表明,耐除草剂性状表现突出,除草效果95%以上,转

基因玉米大豆可增产5.6%至11.6%(http://www.moa.gov.cn/ztl/ymksn/xhsbd/202308/t20230825_6435073.htm)。此外,我国正面临粮食生产集约化、轻简化、机械化转型需求,而HT作物育种及产业化将为这一转型提供支撑。

挖掘具有自主知识产权且性能优异的耐除草剂基因资源,是HT作物培育与产业化的关键。我国在耐草甘膦基因资源方面有一定积累,克隆了多个新的草甘膦耐受基因,主要包括2种类型:一种为对草甘膦耐受的EPSPS合酶,如*Deinococcus radiodurans*来源的G10evo-EPSPS^[6]、*Pseudomonas fluorescens*来源的G2-EPSPS^[7]、源于*Pseudomonas stutzeri*的GR79-EPSPS^[8]和源于*Isoptericola variabilis*的IV-EPSPS^[9];另外一种为能够对草甘膦进行修饰或降解的脱毒酶,包括gat和GlypO^[8, 10]。

收稿日期:2023-11-06

基金项目:国家自然科学基金项目(31971383)

丁宁,E-mail:1027153055@qq.com

通信作者:吴高兵,E-mail:wgb@mail.hzau.edu.cn

耐草甘膦性状长期主导HT作物,草甘膦的长期广泛使用导致抗性杂草的进化和漫延,成为HT作物应用的新挑战^[11]。EPSPS基因专利主要掌握在孟山都、拜耳、先锋、先正达等4家巨头公司(<https://patentscope.wipo.int/>),相比之下我国在EPSPS基因资源上匮乏,核心专利较少。当前,我国大力推进生物育种产业化研究,科学推进抗除草剂及抗虫转基因作物的产业化发展。具有自主知识产权的高性能抗除草剂基因,是开展抗除草剂作物育种研究与产业化的根本前提。

通过基因聚合策略,培育耐不同除草剂的HT作物,进而通过不同除草剂的轮用应对抗性杂草,可有效地解决这一挑战。此外,复合抗性HT作物与复合除草剂联用,对于控制田间已有抗性杂草至关重要。草铵膦除了具有与草甘膦类似的广谱、低毒优点外,还具有见效快的优势。近年来,伴随着精草铵膦酶促合成的工艺日趋完善,成本逐年降低,草铵膦价格将很快媲美草甘膦。因此,培育草甘/铵膦多抗除草剂作物具有广阔的应用前景。

鉴于此,本研究在挖掘新的草甘膦耐受基因的同时,基于自切割肽介导的多顺反子表达策略^[12],构建了一个高抗草甘膦/草铵膦的基因,实现了“一个基因,两种抗性”,旨在进一步挖掘新的草甘膦抗性基因,为耐草甘/铵膦“双抗”作物的育种提供新

思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌(*E. coli*)DH5α、*E. coli* ZD11(*epsps*基因缺陷型菌株)、*E. coli* BL21(DE3)和根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101保存于华中农业大学分子工程实验室。草铵膦乙酰转移酶基因(*Repat*)为实验室前期克隆。

1.2 抗性菌株筛选鉴定及分析

将实验室保藏的海洋菌株活化后接种于含有200 mmol/L草甘膦的2216E培养基(青岛日水生物科技有限公司)平板进行初筛;初筛的菌株单菌落进一步划线接种到含有0、100、200、300 mmol/L草甘膦的M9基础培养基上,筛选到1株能在300 mmol/L高草甘膦浓度条件下生长的菌株;提取该菌株基因组DNA并送至上海派诺森生物有限公司进行测序分析。

1.3 基因克隆及生物信息学分析

根据基因组序列信息,利用Snapgen 4.3.6设计引物fHoEPSPS-F和fHoEPSPS-R扩增该菌株EPSPS基因(*fHoEPSPS*)的ORF,引物序列信息见表1。以pGEX-6p-1为表达载体,通过同源重组法,构建重组质粒pGEX-6p-fHoEPSPS。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in the study

引物 Primers	引物序列(5'→3') Primer sequences	用途 Usage
fHoEPSPS-F	GGAATTCCATGGCCGCTGCGCTTCGCGT	<i>fHoEPSPS</i> 基因扩增
fHoEPSPS-R	CCGCTCGAGTTAGTGGTCATTGGCACC	Amplification of <i>fHoEPSPS</i>
MutaHo-F	TGTATGTAGGTAACCTCTGCAACCGCCATGCCCTGTTGC	<i>mHoEPSPS</i> 表达载体构建
MutaHo-R	TGCAGAGTTACCTACATACAGCGGGCCTGCCG	Construction of <i>mHoEPSPS</i> expression vector
mHo-F	ATGTTGAACAAACCAAGTTATCAGGCGG	<i>mHoEPSPS</i> 表达载体构建
mHo-R	TAACTGGTTTGTCAACATGAATTCCGGGGATCCCAG	Construction of <i>mHoEPSPS</i> expression vector
Repat-F	GTTCCAGGGGCCCTGGATCCATGCTGATTGATG	
Repat-R	CATCTGCTGCATTGCTCAGGGTCAGCTGCAGATAG	
LP4/2A-F	AGCAATGCAGCAGATGAAGTTGCAACACAGCT	<i>RLH</i> 基因扩增
LP4/2A-R	GGTTTTGTTCAACATCGGACCCGGATTG	Amplification of <i>RLH</i>
mHoEPSPS-F	ATGTTGAACAAACCAAGTTATCAGGCGG	
mHoEPSPS-R	GCTCGAGTCGACCCGGAATTCTTAGTGGTCATTGGCACCCCTCCAC	
HoEPSPS-F	GGGGTACCATGGCTCAGGTTCCAGG	
HoEPSPS-R	CGGGATCCTCAGTGGTCGTTACCAAC	转基因载体构建
RLH-F	GAGCTTCGCGAGCTCGGTACCATGGGATCTATGCTCATTAG	Construction of transgenic vector
RLH-R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTCAGTGATCGTTAGCACC	
hpt557-F	ACACTACATGGCGTGATTTCAT	烟草转基因阳性株鉴定
hpt557-R	TCCACTATCGCGAGTACTTCT	PCR identification of transgenic tobacco

1.4 *fHoEPSPS*、*mfHoEPSPS*、*mHoEPSPS* 及融合基因 *RLH* 表达载体构建

通过PCR介导的定点突变技术,设计引物Muta-Ho-F和MutaHo-R将*fHoEPSPS*的第384位G突变为A,构建pGEX-6p-*mfHoEPSPS*重组质粒。通过设计互为同源臂的引物mHo-F、mHo-R,以pGEX-6p-*mfHoEPSPS*为模板,扩增除PDT基因的部分,利用ClonExpress MultiS一步法重组试剂盒(诺唯赞,南京)构建不含PDT的pGEX-6p-*mHoEPSPS*重组质粒。

利用带有载体同源臂的引物Repat-F和Linker LP4/2A同源臂引物Repat-R扩增*Repat*基因,利用引物LP4/2A-F和带有*mHoEPSPS*同源臂的LP4/2A-R引物扩增Linker LP4/2A,利用引物mHoEPSPS-F和带有载体同源臂的引物mHoEPSPS-R扩增*mHoEPSPS*基因,引物序列信息见表1。分别回收相应的PCR产物,将回收得到的3种PCR产物混合作为扩增模板,引物选择Repat-F、mHoEPSPS-R进行扩增,得到*RLH*片段,产物回收后与*Eco*R I和*Bam*H I线性化的载体pGEX-6p-1混合,利用ClonExpress MultiS一步法重组试剂盒构建pGEX-6p-*RLH*重组质粒。

1.5 *fHoEPSPS*、*mfHoEPSPS* 及 *mHoEPSPS* 蛋白表达与纯化

将pGEX-*fHoEPSPS*、pGEX-*mfHoEPSPS*和pGEX-*mHoEPSPS*转化至*E. coli* BL21(DE3),挑取含有重组质粒的单菌落,接种到10 mL含有100 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,180 r/min 37 °C过夜振荡培养。以1%的接种量转接至500 mL LB液体培养基,37 °C培养2~3 h,当OD₆₀₀达0.6时,加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为0.1 mmol/L,18 °C,180 r/min诱导培养16 h。诱导完成后,7 500 r/min离心10 min收集菌体,用预冷的HEPES缓冲液(pH 7.0)洗涤菌体,离心去上清液,洗涤2遍,再用100 mL新鲜HEPES缓冲液充分悬浮菌体,用低温高压破碎仪(JNBIO JN-3000PLUS,广州聚能纳米生物科技股份有限公司)破碎细胞,收集细胞破碎液后12 000 r/min、4 °C离心60 min,收集上清液,进行GST亲和层析纯化^[13]。

1.6 草甘/铵膦抗性验证

将含有pGEX-6p-*fHoEPSPS*、pGEX-6p-*mfHoEPSPS*、pGEX-6p-*mHoEPSPS*、pGEX-6p-*RLH*、

pGEX-6p-*Repat*质粒的菌株*E. coli* ZD11接种至含氨苄青霉素LB培养基中,于37 °C过夜培养,洗涤2遍除去LB营养成分,调整菌体浓度OD₆₀₀至1.0,按2%转接量转接于含有不同浓度(0、100、200 mmol/L)草甘/铵膦的液体M9基础盐培养基中,每组设置3个重复。用Bioscreen全自动生长曲线分析仪检测菌株的生长状况,设置测定时间为2 d,培养温度为37 °C。

1.7 *fHoEPSPS*、*mfHoEPSPS*、*mHoEPSPS* 抑制动力学分析

半抑制剂量(IC_{50})能直观反映出酶对抑制剂的耐受性。设置20 μL的反应体系:2 μL 1 mmol/L莽草酸-3-磷酸(S3P,Sigma,上海),2 μL 1 mmol/L磷酸烯醇式丙酮酸(PEP,Sigma,上海),2 μL纯酶,加不同浓度梯度(10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³、10⁻²、10⁻¹、10⁰、10¹ mmol/L)的草甘膦(Sigma,上海),加用HEPES缓冲液补足到20 μL。28 °C反应4 min,加入800 μL孔雀石绿溶液,1 min后加入100 μL 34%柠檬酸三钠溶液,室温放置30 min后,取200 μL于96孔板中,用预热的酶标仪测定OD₆₆₀值。所得数据利用Graphpad Prism 8进行数据拟合与 IC_{50} 计算。

1.8 烟草遗传转化与除草剂抗性验证

为分析基因*mHoEPSPS*及*RLH*在植物中除草剂抗性水平,本研究将*mHoEPSPS*及*RLH*基因按照烟草密码子的偏好性进行优化合成(由武汉金开瑞生物工程有限公司合成)。以优化合成的序列为模板利用引物对(*mHoEPSPS*-F和*mHoEPSPS*-R)扩增*mHoEPSPS*基因;利用引物对(*RLH*-F和*RLH*-R)扩增*RLH*基因,PCR产物分别回收后,与*Kpn* I和*Bam*H I线性化的载体pCAMBIA1300混合,利用ClonExpress II One Step Cloning Kit通过同源重组,分别构建烟草转化载体pCAMBIA1300-*mHoEPSPS*和pCAMBIA1300-*RLH*。以‘岩烟97’为受体,通过农杆菌介导叶盘转化法,分别构建含*mHoEPSPS*和*RLH*的转基因烟草(*Nicotiana benthamiana*)。提取具有潮霉素抗性的转化体的叶片组织DNA,利用潮霉素抗性基因特异性引物hpt557-F和hpt557-R(表1)进行PCR,鉴定转基因阳性苗。

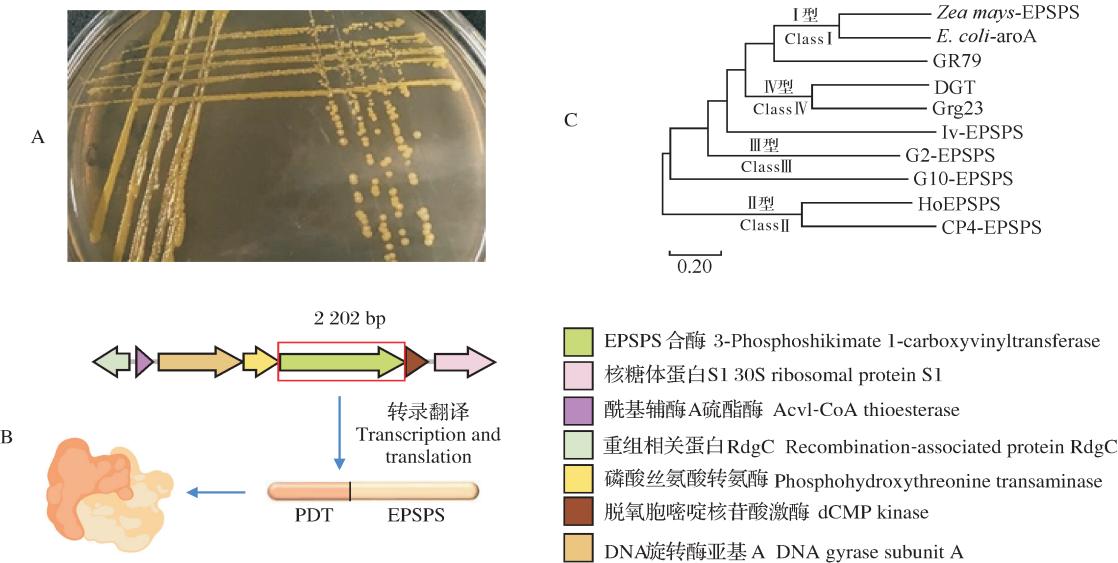
野生型和转基因株系温室生长至6~9叶期时,用2%(商业推荐剂量为0.5%)的农达(41%草甘膦异丙胺盐)喷施处理转*mHoEPSPS*烟草;转*RLH*烟草叶片分别喷洒2%的农达和40%草甘膦·草铵膦复合除草剂(济南兄弟作物科学有限公司),7 d后观察并记录植株的生长与药害情况。

2 结果与分析

2.1 抗性菌株筛选鉴定及测序

本研究通过菌株抗性筛选获得1株能在含有300 mmol/L 草甘膦培养基中生长的菌株(图1A),扩增其16S rRNA基因并进行测序分析与序列比对,鉴定该菌株属于盐单胞菌属(*Halomonas* sp.)。

提取菌株总DNA,进行测序分析,根据全基因组测序结果及注释,获得了草甘膦靶酶EPSPS(*fHo*-EPSPS)。



A: 抗性菌株分离 Original strain isolation by growing on M9 medium supplied with 300 mmol/L glyphosate; B: *fHoEPSPS* 基因组成分析 Analysis of gene structure of *fHoEPSPS*; C: *HoEPSPS* 进化树分析 Phylogenetic analysis of *HoEPSPS*.

图1 抗性菌株分离及基因分析

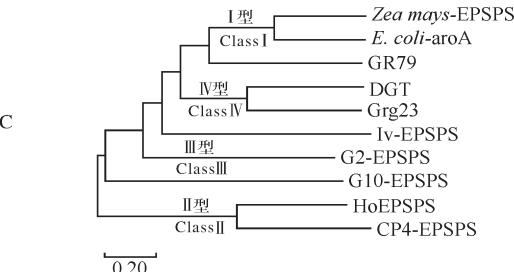
Fig. 1 Isolation of *Halomonas* sp. and gene structure of *fHoEPSPS*

为评价该酶序列新颖性,考虑到 *fHoEPSPS* 中 PDT 结构域会对多序列比对结果产生影响,选择将 *fHoEPSPS* 中不包含 PDT 的部分(命名为 *HoEPSPS*)与已报道的4类EPSPS进行多序列比对,利用软件MEGA 6构建进化树,分析不同酶的序列一致性,结果如图1C所示。*HoEPSPS*在分类上属于II型EPSPS,与CP4-EPSPS、Iv-EPSPS、G2-EPSPS及G10-EPSPS的一致性较低,分别为:41.47%、22.09%、22.49%、22.49%,表明 *fHoEPSPS*是一个新型草甘膦耐受酶。

2.2 *fHoEPSPS* 及其突变体的纯化及抗性比较

对比 *fHoEPSPS*和其他4类EPSPS氨基酸序列,发现他们均具有1个保守motif: $\text{-}_{382}\text{N}_{383}\text{S}_{384}\text{G}_{385}\text{T}_{386}\text{A}_{387}\text{M-}$ 。前期研究结果表明,该motif中的甘氨酸残基与草甘膦的抗性密切相关^[14]。因此,本研究设计 *fHoEPSPS* 中384位G到A的点突变(*mfHoEPSPS*),以进一步提

EPSPS)的基因结构信息,该基因长度为2 202 bp,GC含量60%,可编码733个氨基酸,蛋白质分子质量理论大小为78.25 ku,与已报道的EPSPS蛋白分子质量有较大差异。蛋白序列分析发现该蛋白N端融合了预苯酸脱水酶(PDT),由272个氨基酸残基组成,分子质量为29.45 ku;C端含有EPSPS结构域,包括461个氨基酸残基,分子质量为48.80 ku(图1B)。*fHoEPSPS*基因上下游分别为磷酸丝氨酸转氨酶、核糖体蛋白S1。



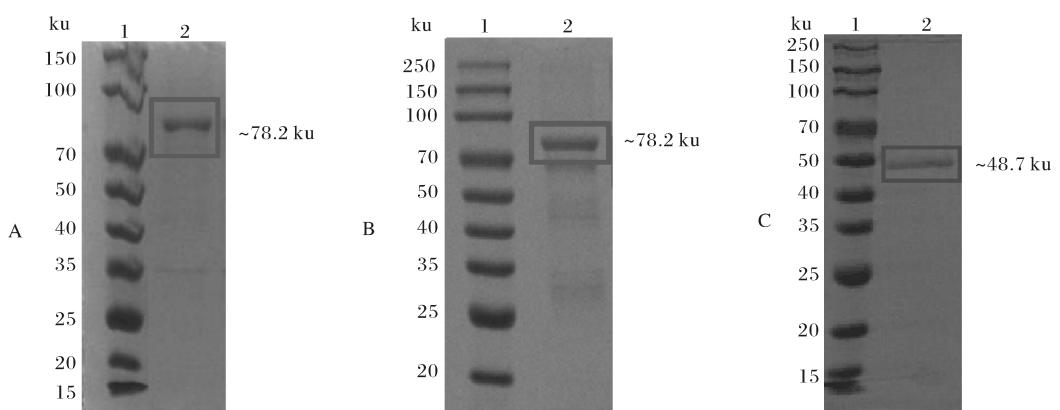
- EPSPS 合酶 3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
- 核糖体蛋白 S1 30S ribosomal protein S1
- 酰基辅酶 A硫酯酶 Acyl-CoA thioesterase
- 重组相关蛋白 RdgC Recombination-associated protein RdgC
- 磷酸丝氨酸转氨酶 Phosphohydroxythreonine transaminase
- 脱氧胞嘧啶核苷酸激酶 dCMP kinase
- DNA旋转酶亚基 A DNA gyrase subunit A

高 *fHoEPSPS* 对草甘膦的抗性水平。

本研究首先纯化 *fHoEPSPS* 及 *mfHoEPSPS* 蛋白,由图2A、B可知,纯化得到条带单一蛋白,且分子量在70~100 ku,与理论分子质量78.2 ku大小一致。利用纯化的酶,测定了二者半抑制浓度 IC_{50} ,结果显示,*fHoEPSPS*与 *mfHoEPSPS*的 IC_{50} 分别为4.83 mmol/L和47.74 mmol/L(图3),表明384位G到A的突变能急剧提高酶对草甘膦耐受性。为了分析N端的PDT对 *mfHoEPSPS* 草甘膦耐受性的影响,将 *mfHoEPSPS* 中PDT进行缺失,得到了不含PDT的 *mHoEPSPS*(图2C)。结果显示, *mHoEPSPS* 的 IC_{50} 为92.30 mmol/L,比野生型 *fHoEPSPS* 高19倍,比 *mfHoEPSPS* 高1.9倍(图3)。以上结果表明,N端的PDT不利于酶对草甘膦的耐受性。

2.3 双抗基因RLH构建与抗性验证

将笔者所在实验室开发的草铵膦抗性基因 *Re-*



A: fHoEPSPS 蛋白纯化 Purification of fHoEPSPS。1: 蛋白分子质量标记 Protein marker; 2: 纯化后的 fHoEPSPS Purified fHoEPSPS;
B: mfHoEPSPS 蛋白纯化 Purification of mfHoEPSPS。1: 蛋白分子质量标记 Protein marker; 2: 纯化后的 mfHoEPSPS Purified mfHoEPSPS;
C: mHoEPSPS 蛋白纯化 Purification of mHoEPSPS。1: 蛋白分子质量标记 Protein marker; 2: 纯化后的 mHoEPSPS Purified mHoEPSPS。

图2 fHoEPSPS、mfHoEPSPS 和 mHoEPSPS 蛋白纯化

Fig. 2 Purification of fHoEPSPS, mfHoEPSPS and mHoEPSPS

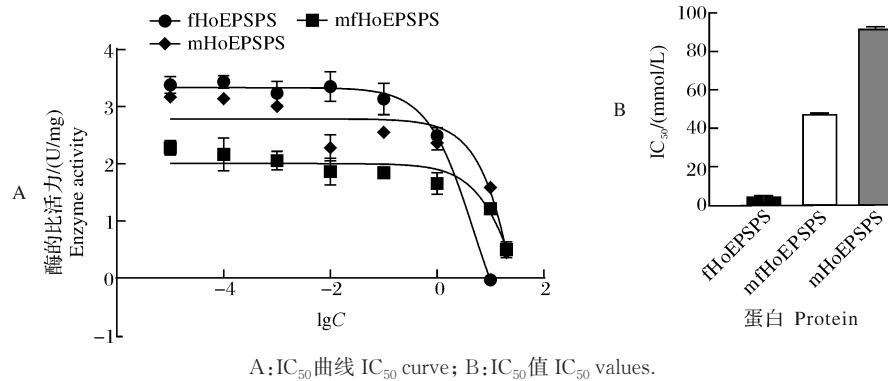


图3 IC₅₀ 比较

Fig. 3 Comparison of IC₅₀

pat 置换掉其 N 端的 PDH 编码区, 添加自切割的 linker LP4/2A, 构建融合基因 *RLH*, 以期实现“一个基因, 两种抗性”。由图 4 可知, 草铵膦抗性基因 *Repat* 与草甘膦抗性基因 *mHoEPSPS* 通过 linker LP4/2A 序列连接。

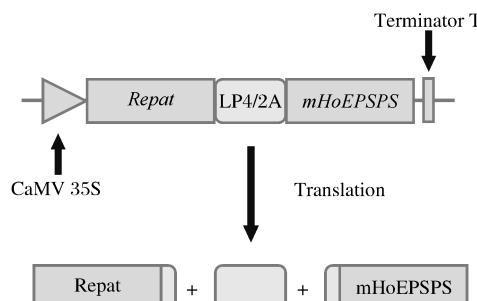


图4 融合表达模式图

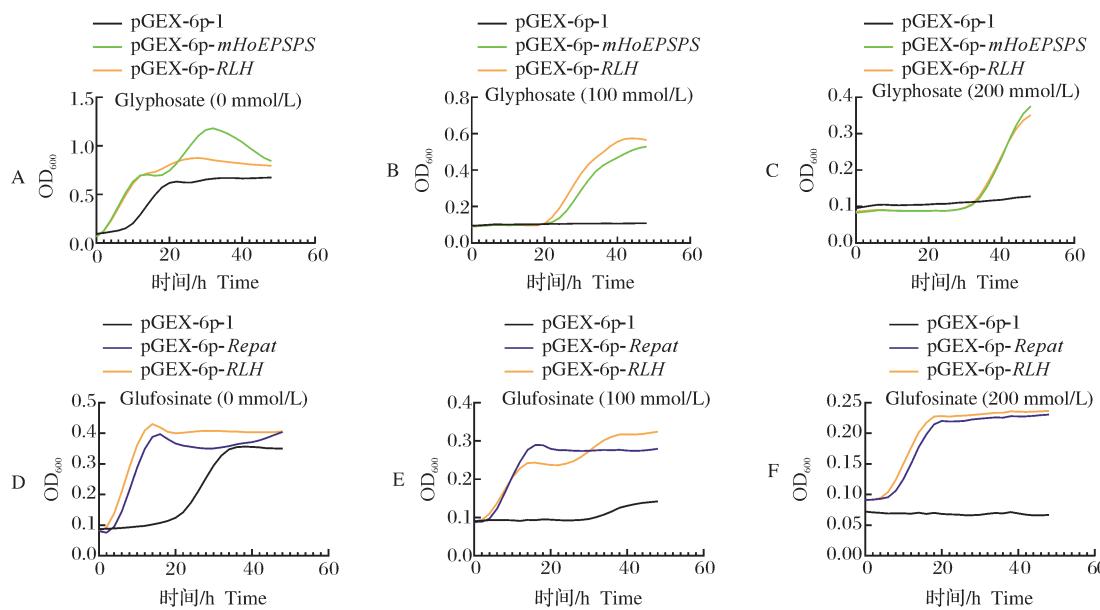
Fig. 4 Fusion expression pattern

为了验证融合基因功能, 本研究将 *RLH* 亚克隆至原核表达载体 pGEX-6p-1, 转化 *E. coli* ZD11 感受态细胞, 对其草甘/铵膦抗性进行验证。由图 5 可知,

RLH 重组菌株草甘膦抗性良好, 在各个草甘/铵膦浓度条件下表现出的生长水平与单基因 *mHoEPSPS* 或 *Repat* 相当。在高浓度的草甘/铵膦(200 mmol/L)压力下, *RLH* 重组菌与单基因重组菌生长能力几乎一致, 表明 2 个基因的融合并未影响各自的抗除草剂功能。

2.4 转基因烟草抗性验证

将 *mHoEPSPS* 和 *RLH* 基因插入到植物表达载体 pCAMBIA1300, 获得烟草转化载体(图 6A、B)。以‘岩烟 97’为受体, 通过叶盘转化法, 获得了转 *mHoEPSPS* 和 *RLH* 的烟草。选择生长健壮的阳性株系, 在 6~9 叶期时, 进行除草剂处理。由图 6C、D 可知, 用 0.5% 的农达处理野生型 WT 株系, 7 d 后植株萎蔫、死亡。转 *mHoEPSPS* 株系在 1.6% 的农达处理后, 生长状态良好, 在 2% 的农达处理时出现萎蔫、枯黄现象, 而转 *RLH* 基因株系在 2% 的农达处理时, 其生长只受到轻微抑制。在草甘膦·草铵膦复合



A:不含草甘膦的基础盐培养基 Basic salt medium without glyphosate; B:含 100 mmol/L 草甘膦的基础盐培养基 Basic salt medium with 100 mmol/L glyphosate; C:含 200 mmol/L 草甘膦的基础盐培养基 Basic salt medium with 200 mmol/L glyphosate; D:不含草铵膦的基础盐培养基 Basic salt medium without glufosinate; E:含 100 mmol/L 草铵膦的基础盐培养基 Basic salt medium with 100 mmol/L glufosinate; F:含 200 mmol/L 草铵膦的基础盐培养基 Basic salt medium with 200 mmol/L glufosinate。

图 5 RLH 的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of RLH

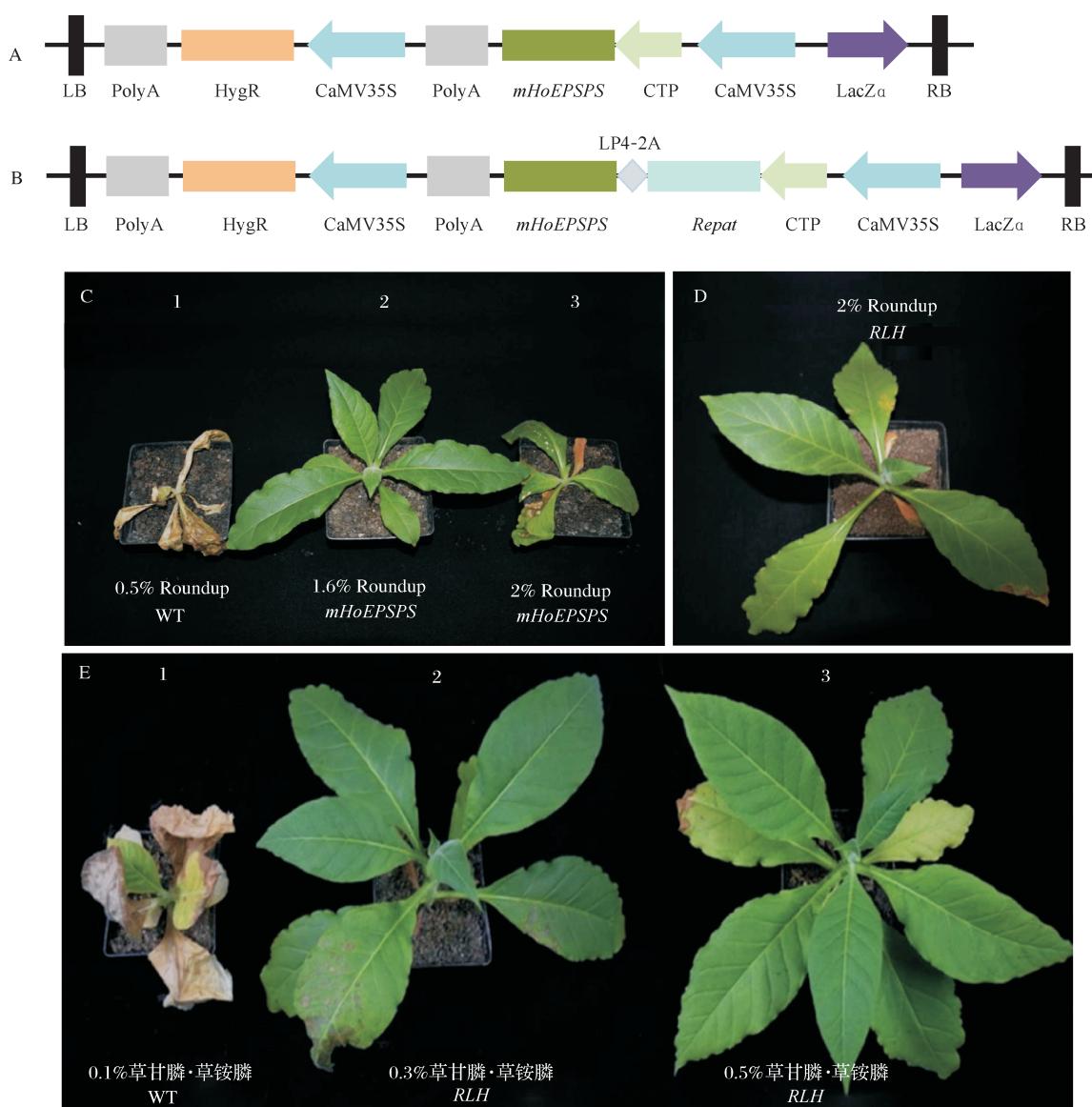
除草剂处理时,WT 株系在 0.1% 的剂量处理后,出现了萎蔫、枯黄现象。转 *RLH* 基因株系在 0.3% 的草甘膦·草铵膦复合农药处理后,整体植株不失绿且生长良好,在 0.5% 的草甘膦·草铵膦处理时,老叶出现少许黄化,但植株仍然可以正常生长(图 6E),表明 *RLH* 转基因烟草能够赋予烟草抗 3~5 倍推荐剂量草甘膦·草铵膦复合除草剂。

3 讨 论

EPSPS 广泛存在植物、细菌及真菌中。植物来源的 EPSPS 普遍对草甘膦敏感,而某些微生物尤其是细菌中 EPSPS 对草甘膦具有抗性,成为抗草甘膦基因资源的主要来源。长期以来,人们更多的是关注土壤微生物来源抗草甘膦 EPSPS 的克隆^[15-17],而海洋环境蕴藏微生物资源,其独特的生态环境决定了基因的多样性和功能的特异性。因此,本研究尝试从海洋菌中筛选新的具有高草甘膦抗性的 EPSPS 基因。首先,利用含不同浓度草甘膦的人工海水培养基 2216E,对笔者所在实验室保藏的海洋菌株进行了抗性筛选,获得了 1 株高耐受草甘膦菌株。通过 16S rRNA 测序鉴定,明确该菌株为盐单胞菌属。考虑到目前未有该菌株高抗草甘膦 EPSPS 的报道,进一步对该菌株进行全基因组测序分析,获得了 EPSPS 基因。发现不

同于目前报道的大多数单功能 EPSPS,来源于 *Halomonas* sp. 的 EPSPS 的 N 端存在一个预苯酸脱水酶(PDT)结构域,以双功能酶的形式表达。

通过多序列比对发现去掉 PDT 部分的酶(Ho-EPSPS)与 CP4-EPSPS 序列一致性仅为 41.47%,与其他商业化应用的 EPSPS 序列一致性小于 30%,是一个新型的草甘膦耐受酶。全长酶 fHoEPSPS 和 HoEPSPS 均能在 *E. coli* 细胞中可溶性表达。序列分析表明,fHoEPSPS 同样含有在 EPSPS 中广泛存在的 motif: $-_{382}N_{383}S_{384}G_{385}T_{386}A_{387}M-$,该 motif 中的甘氨酸残基与草甘膦抗性相关^[14]。因此,本研究将₃₈₄G 突变为₃₈₄A,获得 mHoEPSPS。抗性分析表明,mHoEPSPS 赋予大肠杆菌更高草甘膦抗性,显著高于 fHoEPSPS。考虑到 PDT 结构域对 EPSPS 功能是非必需的,而且用于转基因育种会增加外源蛋白的数量,增大安全评估的成本,本研究将 mHoEPSPS 中的 PDT 缺失,获得 mHoEPSPS。mHoEPSPS 表现出最高的 IC₅₀,意味着具有更高的草甘膦耐受性。因此,本研究在烟草中测试了 mHoEPSPS 对草甘膦的耐受能力与育种应用潜力,结果显示超表达 mHoEPSPS 植株能够耐受 3 倍推荐剂量的草甘膦农药,表明 mHoEPSPS 基因具有一定的育种价值。在后续研究中,可以进一步通过定向进化策略,提高



A: *mHoEPSPS* 转化载体构建示意图 Schematic diagram of *mHoEPSPS* transformation vector construction; B: *RLH* 转化载体构建示意图 Schematic diagram of *RLH* transformation vector construction; C: *mHoEPSPS* 转基因烟草农达抗性验证 Validation of Roundup resistance in *mHoEPSPS* transgenic tobacco, 1: 0.5% 的农达处理野生型烟草 WT 处理 by 0.5% Roundup; 2: 1.6% 的农达处理 *mHoEPSPS* 转基因烟草 *mHoEPSPS* transgenic tobacco treated by 1.6% Roundup; 3: 2% 的农达处理 *mHoEPSPS* 转基因烟草 *mHoEPSPS* transgenic tobacco treated by 2% Roundup; D: 2% 的农达处理 *RLH* 转基因烟草 *RLH* transgenic tobacco treated by 2% Roundup; E: *RLH* 转基因烟草草甘膦·草铵膦抗性验证 Validation of glyphosate·glufosinate resistance in *RLH* transgenic tobacco; 1: 0.1% 的草甘膦·草铵膦处理野生型烟草 WT 处理 by 0.1% glyphosate·glufosinate; 2: 0.3% 的草甘膦·草铵膦处理 *RLH* 转基因烟草 *RLH* transgenic tobacco treated by 0.3% glyphosate·glufosinate; 3: 0.5% 的草甘膦·草铵膦处理 *RLH* 转基因烟草 *RLH* transgenic tobacco treated by 0.5% glyphosate·glufosinate.

图 6 烟草转化载体构建示意图及转基因烟草抗性验证

Fig. 6 Schematic diagram of plant vector construction and transgenic tobacco resistance verification

该基因对草甘膦的抗性水平。

抗草甘膦作物长期主导耐除草剂作物产业,然而全球耐草甘膦杂草多达 58 种,且有逐年增加的趋势,对耐草甘膦作物的持续发展提出了挑战;而已报道的草铵膦抗性杂草目前只有 6 种^[18]。长期单一的使用某一种除草剂必然会导致相应抗性杂草的产

生,因此,培育双抗草甘/铵膦作物,通过轮换使用草甘/铵膦除草剂可有效应对草甘膦抗性杂草的挑战。本研究利用“LP4-2A 自切割肽”将前期开发的高抗草铵膦酶 RepA 与 *mHoEPSPS* 进行融合,创制了双抗草甘/铵膦酶 RLH。LP4-2A 序列为 S-NAADE-VATQLLNFDLLKLAGDVESNPG-P,该序列已被

广泛证实植物细胞内会发生 S-N 之间及 G-P 之间的双位点自切割, 高效释放其两端连接蛋白^[19-21]。草铵膦抗性 Repat 主要在植物细胞质中发挥作用^[21-22], 而草甘膦抗性的 EPSPS 需要定位在叶绿体中发挥功能^[23], 理论上需要 RLH 具有较高的自切割活性, 因此本研究选择 LP4-2A 为自切割 linker。超表达 RLH 的烟草能够耐受 3~5 倍推荐剂量草甘膦·草铵膦复合除草剂, 推测 RLH 在植物细胞内能够高效切割, 释放的酶各自正确定位并发挥功能。在后续的研究中, 可以进一步通过表达定位和 Western blot 分析, 来验证 RLH 的切割效率与功能特点。

本研究利用自切割肽介导的基因堆叠策略, 构建了抗 2 种除草剂的单基因。目前不同抗除草剂基因堆叠的主要策略为使用多个表达框进行共转化, 存在载体构建繁琐, 重复表达元件遗传不稳定, 不同蛋白的表达比例可能失衡等弊端。本研究的 2 个抗性基因只需要一个表达框, 即可实现 1:1 的稳定表达, 具有明显的优势, 这为其他抗除草剂基因的堆叠提供了借鉴。另外, 超表达 RLH 的烟草能够耐受 3~5 倍, 较高的抗性水平意味着 RLH 具有较大的应用潜力。在后续研究中, 可以在不同作物中测试其抗性水平, 进而利用该基因培育抗草甘/铵膦的耐除草剂作物。

参考文献 References

- [1] 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. LI F, LU S Z, LIU Y X, et al. Expression of a novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes (EPSPS) in plastids conferring glyphosate resistance in tobacco [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(5): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [2] TAKANO H K, DAYAN F E. Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge [J]. Pest management science, 2020, 76(12): 3911-3925.
- [3] BROOKES G. Genetically modified (GM) crop use 1996–2020: impacts on carbon emissions [J]. GM crops & food, 2022, 13(1): 242-261.
- [4] KOVAK E, BLAUSTEIN-REJTO D, QAIM M. Genetically modified crops support climate change mitigation [J]. Trends in plant science, 2022, 27(7): 627-629.
- [5] BONNY S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact [J]. Environmental management, 2016, 57(1): 31-48.
- [6] XIAO P Y, LIU Y, CAO Y P. Overexpression of G10-EPSPS in soybean provides high glyphosate tolerance [J]. Journal of integrative agriculture, 2019, 18(8): 1851-1858.
- [7] YANG M K, WEN Z L, FAZAL A, et al. Impact of a G2-EPSPS & GAT dual transgenic glyphosate-resistant soybean line on the soil microbial community under field conditions affected by glyphosate application [J/OL]. Microbes and environments, 2020, 35(4): ME20056 [2023-11-06]. <https://doi.org/10.1264/jmse2.ME20056>.
- [8] LIANG C Z, SUN B, MENG Z G, et al. Co-expression of GR79 EPSPS and GAT yields herbicide-resistant cotton with low glyphosate residues [J]. Plant biotechnology journal, 2017, 15(12): 1622-1629.
- [9] 李杰华, 端群, 史明涛, 等. 新型抗广谱性除草剂草甘膦转基因油菜的创制及其鉴定 [J]. 作物学报, 2021, 47(5): 789-798. 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 (in Chinese with English abstract).
- [10] QIN Y Q, WU G B, GUO Y M, et al. Engineered glyphosate oxidase coupled to spore-based chemiluminescence system for glyphosate detection [J]. Analytica chimica acta, 2020, 1133: 39-47.
- [11] BAEK Y, BOBADILLA L K, GIACOMINI D A, et al. Evolution of glyphosate-resistant weeds [J]. Reviews of environmental contamination and toxicology, 2021, 255: 93-128.
- [12] WANG X K, MARCHISIO M A. Synthetic polycistronic sequences in eukaryotes [J]. Synthetic and systems biotechnology, 2021, 6(4): 254-261.
- [13] YI S Y, WU G B, LIN Y J, et al. Characterization of a new type of glyphosate-tolerant 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Isopetericola variabilis* [J]. Journal of molecular catalysis B: enzymatic, 2015, 111: 1-8.
- [14] SOST D, AMRHEIN N. Substitution of Gly-96 to Ala in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* results in a greatly reduced affinity for the herbicide glyphosate [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1990, 282(2): 433-436.
- [15] HE M, NIE Y F, XU P L. A T42M substitution in bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003, 67(6): 1405-1409.
- [16] SUN Y C, CHEN Y C, TIAN Z X, et al. Novel *AroA* with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China [J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(8): 4771-4776.
- [17] GUO B F, GUO Y, HONG H L, et al. Co-expression of G2-EPSPS and glyphosate acetyltransferase GAT genes conferring high tolerance to glyphosate in soybean [J/OL]. Frontiers in plant science, 2015, 6: 847 [2023-11-06]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00847>.

- [18] HEAP I. The international herbicide-resistant weed database [DB/OL].[2023-11-06].<http://www.weedscience.org>.
- [19] LUKE G A, ROULSTON C, TILSNER J, et al. Growing uses of 2A in plant biotechnology [M/OL]//DENIZ E. Biotechnology. London: IntechOpen, 2015, 165-193 [2023-11-06].<https://www.intechopen.com/books/4529>.
- [20] SUN H, ZHOU N, WANG H, et al. Processing and targeting of proteins derived from polyprotein with 2A and LP4/2A as peptide linkers in a maize expression system [J/OL]. PLoS One, 2017, 12(3) : e0174804 [2023-11-06].<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174804>.
- [21] YU X X, SUN Y Z, LIN C Y, et al. Development of transgenic maize tolerant to both glyphosate and glufosinate [J/OL]. Agronomy, 2023, 13(1) : 226 [2023-11-06].<https://doi.org/10.3390/agronomy13010226>.
- [22] CUI Y, LIU Z D, LI Y, et al. Application of a novel phosphinothricin N-acetyltransferase (*RePAT*) gene in developing glufosinate-resistant rice [J/OL]. Scientific reports, 2016, 6: 21259[2023-11-06].<https://doi.org/10.1038/srep21259>.
- [23] ACHARY V M M, SHERI V, MANNA M, et al. Overexpression of improved *EPSPS* gene results in field level glyphosate tolerance and higher grain yield in rice [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(12):2504-2519.

Cloning, identification, and application of glyphosate resistant *EPSPS* derived from *Halomonas* sp.

DING Ning¹, HE Yunhao¹, WU Linfei², LI Chanjuan^{2,3}, WU Gaobing¹

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
 2. College of Food and Biological Engineering, Wuhan Institute of Design and Science, Wuhan 430205, China;
 3. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A highly glyphosate resistant strain of *Halomonas* sp. was screened from marine bacteria to breed crops with high glyphosate resistance to cope with the evolution of glyphosate weeds. The gene encoding EPSPS in this strain was identified through sequencing genome and bioinformatics analysis. The fHoEPSPS, mfHoEPSPS (G384A site mutant), and mHoEPSPS (a mutant with N-end PDT deletion of mfHoEPSPS) were recombinantly expressed and purified in *E. coli* (DE3). A gene pyramiding strategy mediated by the self-cleaving peptide LP4/2A was used to locate the glufosinate-resistant enzyme (Repat) at the N-end of mHoEPSPS. A dual resistance to glyphosate/ammonium phosphatase (RLH) was constructed. Tobacco transformed with the RLH gene exhibited simultaneous resistance to glyphosate/glufosinate compound herbicides. The results showed that the *EPSPS* gene (*fHoEPSPS*) of this strain encoded an N-end fused with a bifunctional enzyme of prephenate dehydratase (PDT). The results of analyzing glyphosate resistance showed that the resistance of mfHoEPSPS was 19 times higher than that of fHoEPSPS. Introducing the coding gene of *mHoEPSPS* into tobacco endowed tobacco with three times the recommended dose of glyphosate tolerance. Tobacco plants transformed with the RLH gene had simultaneous tolerance 3-5 times the recommended dosage of glyphosate/ammonium phosphine compound herbicides. It is indicated that the glyphosate-resistant EPSPS derived from *Halomonas* sp. is a new type of glyphosate-tolerant enzyme. The enzyme activity is further improved through the G384A site mutation. The transgenic tobacco with RLH gene obtained through gene pyramiding strategy mediated by the self-cleaving peptides shows high glyphosate/glufosinate compound resistance. It will provide ideas for dealing with the evolution of glyphosate weeds.

Keywords herbicide-resistant crops; glyphosate-resistant 5-enolshikimate-3-phosphate synthase; glufosinate acetyltransferase; dual herbicide-resistant crops; gene pyramiding

(责任编辑:葛晓霞)