

草甘膦抗性菌株的分离鉴定及其抗性基因的克隆

杨小艳¹, 刘亚娟², 吴红¹, 王忠伟¹, 雷开荣¹, 谢树章^{1*}

(1.重庆市农业科学院生物技术研究中心, 重庆 401329; 2.重庆能源职业学院, 重庆 402260)

摘要:从草甘膦污染土壤中分离获得一株耐受 400 mmol/L 草甘膦的菌株 S1536, 该菌株在草甘膦浓度为 100~400 mmol/L 之间生长迅速, 最适 pH 为 6.0, 最适生长温度为 30℃, 具有氨苄青霉素抗性。以 S1536 基因组 DNA 为模板, 通过通用引物进行扩增、测序获得其 16S rDNA 序列, 在 GenBank 登录号为 MG519831, 在 NCBI 中经 BLAST 比对与泛菌属 (*Pantoea* sp.) 同源性达到 99%。用 ClustalW 对 S1536 与泛菌属各个种模式菌的 16S rDNA 进行多重序列对比, 该菌株与 *Pantoea rodasii* 同源性最为接近, 达到 99.2%, 故将菌株 S1536 命名为 *Pantoea rodasii* S1536。该菌株具有较高草甘膦抗性, 对温度和 pH 适应性强, 是优良的耐草甘膦菌株, 通过全基因组测序及基因注释, 获得抗除草剂基因 *aroA* 序列, 为下一步明确基因功能, 挖掘 *Pantoea rodasii* S1536 高抗草甘膦的分子机制奠定基础。

关键词:草甘膦抗性; 鉴定; 生长特性; 泛菌属

doi:10.13304/j.nykjdb.2017.0824

中图分类号:Q939

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2018)06-0047-08

Isolation, Identification and Its Resistant Gene Cloning of a New Glyphosate-resistant Strain

YANG Xiaoyan¹, LIU Yajuan², WU Hong¹, WANG Zhongwei¹, LEI Kairong¹, XIE Shuzhang^{1*}

(1.Biotechnology Research Center, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329;

2.Chongqing Energy College, Chongqing 402260, China)

Abstract: A 400 mmol/L glyphosate-resistant strain S1536 was isolated from the glyphosate polluted soil. The strain grew well in the medium with glyphosate concentration between 100~400 mmol/L. The optimal pH was 6.0, optimal growth temperature was 30℃, and had resistance to ampicillin. Taking S1536 genomic DNA as a template, this experiment carried out amplification and sequencing and gained 16S rDNA sequence, which registration number was MG519831 in GenBank. Compared with the published nucleotide sequence of 16S rDNA in NCBI (National Center for Biotechnology Information), S1536 showed 99% homology with *Pantoea* sp. Multiple sequence comparison between S1536 and the model bacteria of *Pantoea* sp. of 16S rDNA was conducted by ClustalW. This strain showed high identity with *Pantoea rodasii*, reaching 99.2%, so it was named as *Pantoea rodasii* S1536. The strain possessed higher glyphosate resistance and good adaptability to temperature and pH. It was a superior glyphosate tolerant strain. *aroA* sequence resistant to herbicide was obtained through whole genome sequencing and gene annotation, which provided a solid foundation for further identification of gene function and exploitation of the molecular mechanism of high glyphosate resistance of *Pantoea rodasii* S1536.

Key words: glyphosate resistance; identification; growth characteristics; *Pantoea* sp.

草甘膦 (glyphosate) 作为一种广谱性除草剂, 防治一年生杂草和依靠根系繁殖的多年生杂草^[2]。当前, 草甘膦已成为全球使用量最大、应在世界农业中具有划时代的意义^[1], 可以有效的

收稿日期: 2017-11-28; 接受日期: 2018-01-17

基金项目: 重庆市农业科学院良种创新暨重大科技推广项目 (NKY-2016AA003-2); 重庆市基础科学与前沿技术研究一般项目 (cstc2017jcyjAX0395); 重庆市科研院所绩效激励引导专项 (cstc2017jxjl80001) 资助。

作者简介: 杨小艳, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农作物转基因技术及其应用。E-mail: yangxiaoyan6600@126.com。* 通信作者: 谢树章, 副研究员, 硕士, 研究方向为植物生物技术及遗传育种。E-mail: 110970224@qq.com

用最广的农药之一。由于草甘膦是磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)的相似物,可以通过竞争性抑制 PEP 与 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合酶(EPSPS)的结合,形成稳定 EPSPS-S3P-glyphosate 络合物,从而阻断 PEP 与莽草酸-3-磷酸(S3P)反应生成烯醇丙酮酸磷酸莽草酸(EPSP)^[3],最终阻止芳香族氨基酸的生物合成。EPSPS 活性被抑制使莽草酸在植物体内迅速累积^[4],芳香族氨基酸的合成被遏制,最终导致植物的死亡。但它作为一种非选择性除草剂,在杀死杂草的同时对农作物同样有灭生性作用^[5],这就大大限制了草甘膦在农业生产中的应用,挖掘抗性基因、培育抗草甘膦转基因作物成为解决这一难题的有效途径。

草甘膦抗性基因的来源主要有 2 种:一是通过筛选抗草甘膦物种,从中克隆得到草甘膦抗性基因。目前,已在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) CP4 菌株、无色杆菌(*Achromobacter strain*) LBAA、假单胞菌(*Pseudomonas strain*) PG2982、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等微生物中发现了具有抗性的 EPSPS 基因^[6~8],其中从鼠伤寒沙门氏菌和根癌农杆菌中分离的 EPSPS 抗性基因在部分作物中已批准商业化生产。二是对 EPSPS 基因突变,获得草甘膦抗性突变体。当前草甘膦抗性基因资源狭窄,需要挖掘一些新型的草甘膦抗性基因,这对培育转基因抗草甘膦植物有重大意义。利用专利搜索引擎(<http://www.soopat.com/>)检索,我国草甘膦基因相关专利共有 31 个,26 项来自细菌,5 项来自植物,由此可见,从细菌里挖掘抗草甘膦基因非常有效,分离草甘膦抗性菌株成为第一要务。目前,有关抗草甘膦菌株的分离,国内外已有很多报道^[9~15],筛选出的细菌菌株草甘膦耐受性一般在 200~500 mmol/L 之间。本研究从草甘膦污染土壤中筛选到一株能耐受 400 mmol/L 草甘膦的菌株 S1536,通过形态学指标和 16S rDNA 序列分析对其进行了鉴定,初步确定为泛菌属,并对该菌株的生长特性及草甘膦抗性基因序列进行了初步分析,克隆了草甘膦抗性基因,为下一步培育具有自主知识产权的抗草甘膦作物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 供试土壤样品采自四川省乐山市某草甘膦生产厂区附近。

1.1.2 培养基 LB 培养基、M9 培养基的配制参照《分子克隆实验指南》^[16],不同 pH 的 LB 培养基用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 溶液进行调节,121℃ 高压湿热灭菌即可。

1.1.3 主要试剂和仪器 主要试剂:41% 草甘膦异丙铵盐购自美国孟山都公司;氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素及其他普通化学试剂均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;SK8255 试剂盒、SK8131 试剂盒均购自上海生物工程有限公司;引物合成及测序由上海生物工程有限公司完成;菌株全基因测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

主要仪器:U9100A 紫外可见分光光度计购自北京莱伯泰科仪器股份有限公司。

1.2 草甘膦抗性菌株的筛选及形态学鉴定

称取采集的土壤样品 10 g,加入 90 mL 灭菌水混匀制成样液。吸取 2 mL 样液移接至含 150 mmol/L 草甘膦的 M9 液体培养基中,28℃、200 r/min 振荡培养 3 d。取 2 mL 上述培养液加入到含 300 mmol/L 草甘膦的 M9 液体培养基中,28℃、200 r/min 振荡培养 3 d。依此类推,将前一轮培养液依次加入含 350 mmol/L、400 mmol/L、450 mmol/L、500 mmol/L 草甘膦的 M9 基础盐液体培养基中,28℃、200 r/min 振荡培养 3 d,筛选出菌液能耐受的最高草甘膦浓度。取能耐受最高草甘膦浓度的菌液涂布接种于相应浓度的草甘膦 M9 固体培养基上,获得耐受该浓度草甘膦的单菌落,接种至 LB 培养基上。对筛选出的单一菌株进行细菌形态、生理生化综合特征等形态学鉴定。包括革兰氏染色、细胞形态、接触酶、氧化酶、吲哚试验、MR 试验等^[17]。

1.3 菌株 16S rDNA 序列分析

按 SK8255 试剂盒操作提取基因组 DNA,以 27F: AGTTTGATCMTGGCTCAG; 1492R: GGTTAC-CTTGTTACGACTT 为引物扩增菌株的 16S rDNA。

用 SK8131 试剂盒回收 PCR 产物后直接测序。将所得到的核苷酸序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上用 BLAST 程序与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较,确定与该菌株同源性最高的属,在 NCBI 数据库中检索该属各个种的 16S rDNA 序列,用 ClustalW 分析其系统进化关系。利用 MEGA6.0 软件的 Neighbor-Joining 方法^[18]构建进化树,最终确定该菌株的分类地位。

1.4 菌株的草甘膦耐受性分析

将对数生长期菌株按 1:1 000 的接种量接种至草甘膦浓度分别为 0 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L 的 M9 液体培养基中,28℃ 振荡培养,在 72 h 内每隔 12 h 测定一次培养液的 OD₆₀₀。

1.5 菌株对 4 种常用抗生素敏感性测定

抗生素种类及其工作浓度分别为:氨苄青霉素 50 μg/mL、氯霉素 170 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL、四环素 50 μg/mL。取 100 μL 对数生长期菌株分别涂布到相应浓度抗生素的 LB 固体培养基上,28℃ 恒温培养过夜,观察菌株生长情况。

1.6 pH、温度对菌株生长的影响

将对数生长期菌株按 1:1 000 的接种量分别接种于 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 LB 液体培养基中,在 28℃ 条件下摇床培养 12 h,测定菌液 OD₆₀₀ 进行分析。

将对数生长期菌株按 1:1 000 的接种量接种于 LB 液体培养基中,分别在温度为 28℃、30℃、35℃、37℃、40℃ 的条件下摇床培养 12 h,测定菌液 OD₆₀₀ 进行分析。

1.7 菌株草甘膦抗性基因序列分析及克隆

通过全基因组测序及基因注释,获得抗除草剂基因 *aroA* 序列,序列比对采用 NCBI 网站的 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),氨基酸序列的翻译及比对用 vector NTI 完成。根据基因注释获得的抗草甘膦基因 *aroA*_{S1536} 序列,设计引物 (F: 5'-ATGCAGGACTCTCTGACCCT-3'; R: 5'-TCAGCTGGTGTGGCTGATCT-3'),以 *Pantoea rodasii* S1536 基因组 DNA 为模板,克隆 *aroA*_{S1536} 基因。

2 结果与分析

2.1 草甘膦抗性菌株的分离及形态学鉴定

经过对菌株的富集培养与划线筛选,得到能在草甘膦浓度为 400 mmol/L 的 M9 平板上生长良好的菌株 S1536,用于进一步研究。对菌株 S1536 进行了形态学观察及鉴定,菌落在 LB 培养基上为圆形,呈黄色、不透明,边缘整齐、低凸、光滑(图 1A)。菌株革兰氏染色为阴性,短杆状(图 1B)。

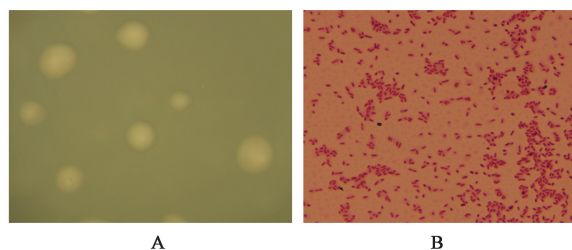


图 1 菌株 S1536 生长形态 (A) 及革兰氏染色 (B)

Fig.1 Growth (A) and gram staining (B) of strain S1536.

生理生化特征鉴定结果见表 1,该菌株接触酶试验为阳性,氧化酶、吲哚试验为阴性,MR 可变。鸟氨酸和精氨酸脱羧酶反应呈阴性,不水解脲素,大多数菌株可生长于氰化钾。丙二酸盐利用在菌株间可变,硝酸盐还原阳性。多数或大多数菌株可利用的碳源包括:L-阿拉伯糖、D-乳糖、麦芽糖、蔗糖、维阿洛酮糖和蜜二糖。通过查询伯杰细菌鉴定手册与微生物分类学^[19,20],初步鉴定为泛菌属。

2.2 菌株 16S rDNA 序列分析及分子鉴定

以 S1536 基因组 DNA 为模板,27F、1492R 为引物,PCR 扩增产物测序得到 1 384 bp 的碱基序列,提交到 GenBank,登录号为 MG519831。用 BLAST 对菌株 S1536 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已收录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,结果发现菌株 S1536 与泛菌属 (*Pantoea* sp.) 同源性达到 99%。结合生理生化实验结果判断,将菌株 S1536 确定为泛菌属 (*Pantoea* sp.)。用 ClustalW 对 S1536 与泛菌属各个种模式菌的 16S rDNA 进行多重序列对比,用 MEGA6.0 软件采用邻接法“Neighbor-Joining”构建成系统发育树(图 2)。从图 2 可以看出,该菌

表 1 菌株 S1536 生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identificationof the strains S1536.

特征 Characters	结果 Results	特征 Characters	结果 Results
接触酶 Catalase	+	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-
氧化酶 Oxidase	-	脲酶 Urease	-
吲哚 Indole	-	氰化钾 KCN	+
MR 试验 MR test	d	丙二酸盐 Malonate	d
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase test	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	D-乳糖 D-lactose	d
乳果糖 Lactulose	-	蜜二糖 Melibiose	d
维阿洛酮糖 Vialoxone	+	蔗糖 Sucrose	+
麦芽糖 Maltose	+	木糖醇 Xylitol	-

注：-：90~100% 菌株阴性；+：90%~100% 菌株阳性；d：11%~89% 菌株阳性。

Note：-： 90~100% strains negative；+： 90%~100% strains positive；d： 11%~89% strains positive.

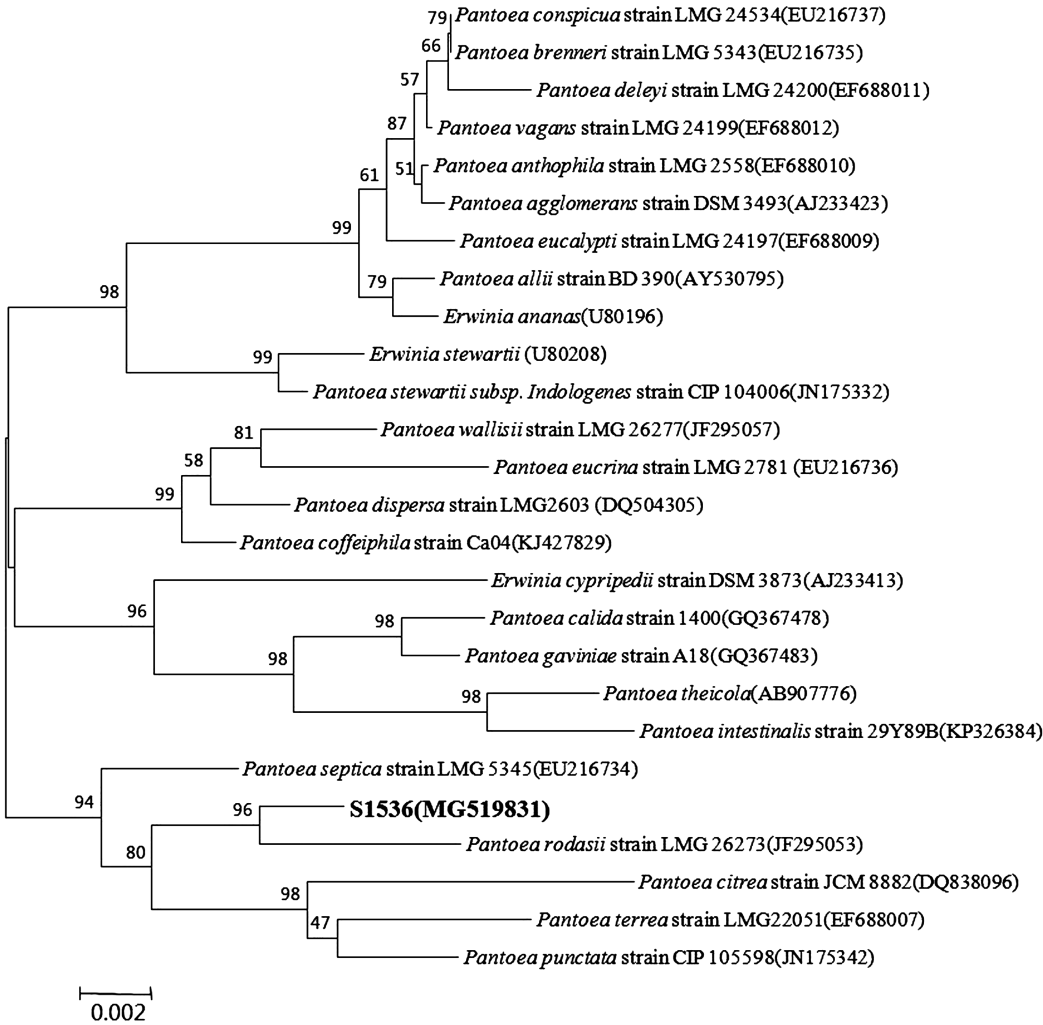


图 2 菌株 S1536 基于 16S rDNA 序列的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of the strain S1536 based on sequences of 16S rDNA.

株与 *Pantoea rodasii* 同源性最为接近,达到99.2%,故将菌株 S1536 命名为 *Pantoea rodasii* S1536。

2.3 菌株的草甘膦耐受性鉴定

在不加草甘膦的 M9 液体培养基中,菌株生长缓慢,36 h 达到生长峰值,OD₆₀₀ 仅为 0.17;草甘膦浓度在 100~400 mmol/L 之间,菌生长迅速;草甘膦浓度为 100 mmol/L 时 48 h 后培养液的 OD₆₀₀ 达到最大值;草甘膦浓度为 200 mmol/L、300 mmol/L 时菌的生长趋势一致,于 72 h 后培养液 OD₆₀₀ 达到最大值;草甘膦浓度 400 mmol/L 时,48 h 之前对菌的生长抑制作用很强,之后迅速生长,于 72 h 后培养液 OD₆₀₀ 达到最大值。草甘膦浓度为 200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L 的 OD₆₀₀ 最大值分别为 0.33、0.36、0.32。草甘膦浓度超过 500 mmol/L 之后,菌基本不生长(图 3)。由此可见,一定浓度的草甘膦会促进菌株的生长,该菌株这种嗜草甘膦的特点与某些菌株的嗜盐^[20]或嗜酸特性相类似。

2.4 菌株的抗生素敏感性检测

对 4 种常用作抗性标记的抗生素敏感性测定结果表明,在各个抗生素工作浓度条件下,分离菌株 S1536 对氨苄青霉素有抗性,对卡那霉素、氯霉素和四环素无抗性。

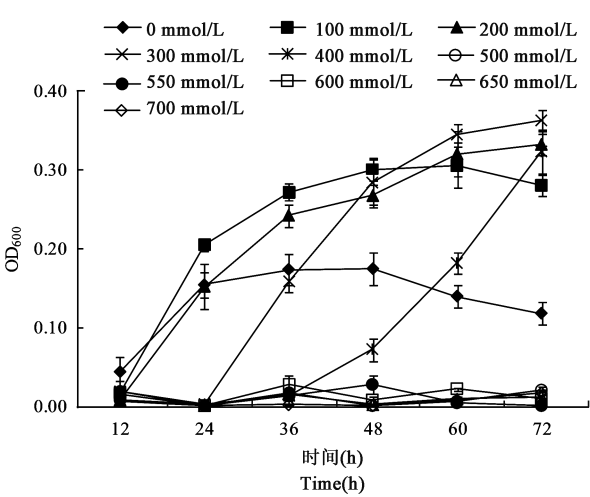
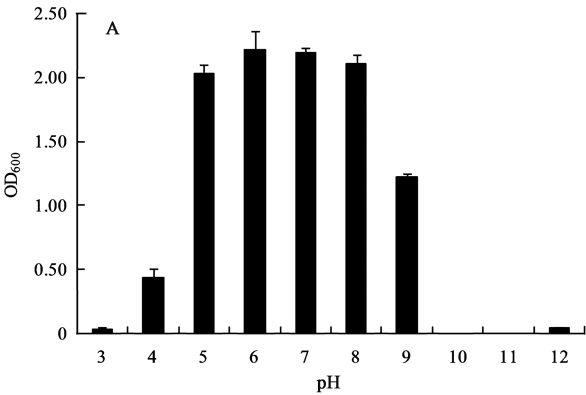


图 3 菌株 S1536 在不同浓度草甘膦 M9 液体培养基中的生长情况

Fig.3 Growth of strain S1536 in M9 liquid medium with different concentrations of glyphosate.

2.5 pH、温度对菌株生长的影响

菌株在 pH 5~9 之间均能生长,12 h 后 pH 5~8 之间生长状态一致,OD₆₀₀ 均能达到 2.0 以上,其中 pH6.0 时生长状态最佳,说明此菌株可以适应的 pH 区间较广,但在偏酸性环境中生长状态较好(图 4A)。培养 12 h 后培养液的 pH 变化结果见表 2,培养前 pH 3~8,培养后 pH 均升高了,

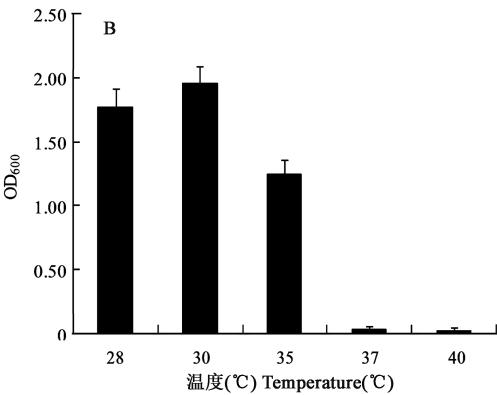


图 4 pH (A) 和温度 (B) 对菌株 S1536 生长的影响

Fig.4 Influence of pH (A) and temperature (B) on the growth of the strain S1536.

表 2 培养前后培养液的 pH 变化

Table 2 Comparison of the value of the pH in the medium before and after the cultivation.

处理 Treatment	pH									
培养前 Before cultivation	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
培养后 After cultivation	3.14	4.10	7.18	7.93	8.24	8.32	8.16	8.84	9.06	9.34
变化值 Variation	0.14	0.10	2.18	1.93	1.24	0.32	-0.84	-1.16	-1.94	-2.66

培养前 pH 9~12,培养后 pH 均降低了,培养后菌株能生长的培养液 pH 在 7.18~8.32 之间,说明菌株在生长的过程中产生了某些次级代谢物质,从而改变了培养液的 pH,使培养液的 pH 更接近中性。菌株 S1536 在 28~35℃ 之间均能生长,最适宜生长温度为 30℃ (图 4B)。

2.6 菌株草甘膦抗性基因 *aroA* 序列的生物信息学分析

通过对泛菌属 S1536 的全基因组测序及基因注释,得到一段长为 1 287 bp 的抗草甘膦基因 *aroA*_{S1536},共编码 428 个氨基酸,分子量为 46.123 kDa。根据基因注释获得的抗草甘膦基因 *aroA*_{S1536} 序列,设计引物,以菌 *Pantoea rodasii*

S1536 基因组 DNA 为模板,扩增获得一条 1 287 bp 的片段,经回收测序验证,与全基因组测序获得的基因序列一致。

将氨基酸序列进行多重比对,结果如图 5 所示,在氨基酸序列的第 91-98 和第 175-183 位有 Class I EPSPS 基因功能保守序列 -L-G-N-A-G-T-A-和-A-L-L-M-T-A-P-L-A-^[21],其中-L-G-N-A-G-T-A-是 EPSPS 与 PEP 或草甘膦相互作用的关键区域^[22]。由此可以推断泛菌属 S1536 菌株中 *aroA*_{S1536} 编码的 EPSPS 属于典型 Class I EPSPS,具有很高的突变改造应用价值,开发利用有待进一步研究。

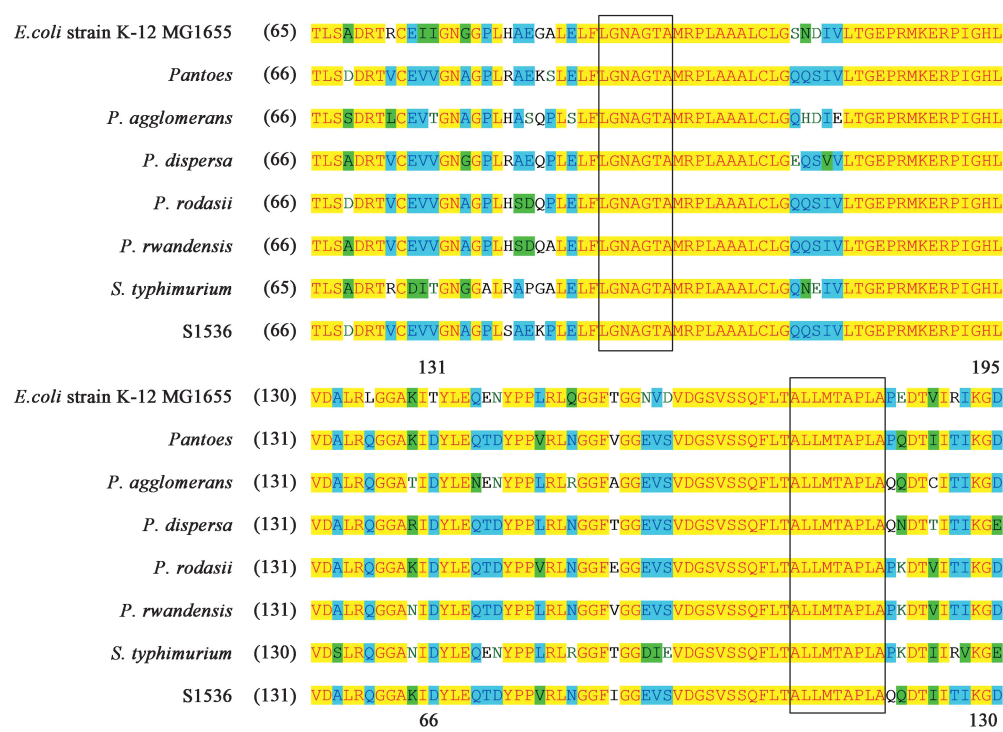


图 5 泛菌属不同成员及其他相关细菌间 *aroA* 氨基酸序列比较

Fig.5 Amino acid sequence alignment of *aroA* among different members of the *Pantoea* and other related bacteria.
注:方框内为推导 class I *aroA* 的保守序列。
Note: Conservative sequences of class I *aroA* are boxed.

3 讨论

目前,已有许多关于真细菌耐受草甘膦的研究,但在已有文献报道的菌株中,菌株能够耐受的草甘膦浓度差异较大,细菌一般相对较低,主要是 10~200 mmol/L^[23~27],极少数菌株耐受草甘膦浓

度较高,为 300~600 mmol/L^[13,28,29]。真菌相对较高,其中于海涛等^[30]利用富集培养的技术,在草甘膦生产厂家长期排污口的土壤中分离出一株抗草甘膦浓度达到 900 mmol/L 的酵母菌。本研究从草甘膦污染土壤中筛选分离出一株最高能耐受 400 mmol/L 草甘膦的细菌高抗菌株 *Pantoea rodasii* S1536,该菌株对温度和 pH 适应性强,是

优良的耐草甘膦菌株,为克隆抗草甘膦基因奠定了坚实的材料基础。

经形态学及 16S rDNA 鉴定,将该菌株命名为泛菌属 S1536(*Pantoea rodasii* sp. S1536),泛菌属普遍存在于植物表面、土壤、动物、种子和水中,在全球各个地区应该都能分离得到^[31]。泛菌属的研究主要集中在植物病害上,从中挖掘 EPSPS 基因的报道较少。目前,几乎所有的商业化抗草甘膦作物用的 EPSPS 基因都来自于农杆菌菌株 CP4^[32],Liu 等^[33]从严重污染的土壤中分离出一株抗草甘膦的泛菌属菌株,并通过同源克隆出 *aroA* 基因,结果表明这种 *aroA*_{P_{pantoea}} 对草甘膦不敏感。本研究从草甘膦污染土壤中筛选到一株能耐受 400 mmol/L 草甘膦的菌株 *Pantoea rodasii* S1536,通过全基因组测序及基因注释,获得抗除草剂基因 *aroA* 序列,为下一步明确基因功能,挖掘 *Pantoea rodasii* S1536 高抗草甘膦的分子机制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 王 慧,闫晓红,徐 杰,等.我国抗草甘膦基因的发掘现状[J].农业生物技术学报,2014,22(1):109-118.
Wang H, Yan X H, Xu J, et al.. Current status of excavation glyphosate-resistant gene in China [J]. Agric. Biotechnol., 2014, 22(1): 109-118.
- [2] Baylis A D. Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects [J]. Pest Manage. Sci., 2015, 56(4): 299-308.
- [3] Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttlesworth W A, et al.. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(4): 1376-1380.
- [4] Preston C, Wakelin A M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns [J]. Pest Manage. Sci., 2008, 64(4): 372-376.
- [5] 谢树章,杨小艳,林 清,等.抗草甘膦转基因玉米研究进展[J].中国农业科技导报,2013,15(3):36-41.
Xie S Z, Yang X Y, Lin Q, et al.. Process on glyphosate-resistant transgenic maize [J]. J. Agric. Sci. Technol., 2013, 15(3): 36-41.
- [6] Comai L, Facciotti D, Hiatt W R, et al.. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate [J]. Nature, 1985, 317: 741-744.
- [7] Padgett S R, Kolacz K H, Delannay X, et al.. Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line [J]. Crop Sci., 1995, 35: 1451-1461.
- [8] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al.. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases [P]. USA, US5804425.
- [9] Moore J K, Braymer H D, Larson A D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 46(2): 316-320.
- [10] O'Connell C, Pattee P A, Foster T J. Sequence and mapping of the *aroA* gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4 [J]. J. Gen. Microbiol., 1993, 139(7): 1449-1460.
- [11] Duncan K, Lewendon A, Coggins J R. Mutant EPSP synthase genes from tomato, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, glycine max *E. coli* K-12 confer tolerance to glyphosate [J]. FEBS Lett., 1984, (170): 59-63.
- [12] 刘 柱,梁爱敏,张 维,等.极端污染环境杂草甘膦抗性菌株 HTG7 的筛选及其特性研究[J].微生物学通报,2004(1): 35-39.
Liu Z, Liang A M, Zhang W, et al.. Separation and characterization of glyphosate-tolerant bacterial strain HTG7 from extremely polluted environment [J]. Microbiol. China, 2004(1): 35-39.
- [13] 沙纪莹,金 丹,陆 伟,等.极端污染环境草甘膦抗性菌株的分离、鉴定及特性[J].微生物学报,2008(6):824-828.
Sha J Y, Jin D, Lu W, et al.. Isolation and characterization of a new glyphosate-resistant strain from extremely polluted environment [J]. Acta Microbiol. Sin., 2008(6): 824-828.
- [14] 李海红,宛煜嵩,金尧军,等.草甘膦高抗菌株的分离、鉴定及生理生化特性研究[J].中国农业科技导报,2009,11(2):69-72.
Li H H, Wan Y S, Jin W J, et al.. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-tolerant bacterial strain [J]. J. Agric. Sci. Technol., 2009, 11(2): 69-72.
- [15] 王 冰,杜 锦,向春阳,等.草甘膦抗性菌株假单胞菌 P818 的筛选鉴定[J].天津农业科学,2016,22(1):27-31.
Wang B, Du J, Xiang C Y, et al.. Screening and identification of glyphosate-resistant strain pseudomonas 818 [J]. Tianjin Agric. Sci., 2016, 22(1): 27-31.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1996.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 1996.
- [17] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科技出版社,1982.
Zhou D Q. Manual of Microbiology Experiments [M]. Shanghai: Science Press, 1982.
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al.. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol. Biol. Evol., 2013, 30(12): 2725-2729.
- [19] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.
Zhang J Z. Microbial Taxonomy [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1990.
- [20] Breed E G, Murray D, Smith N R. Berger's Manual of Determinative Bacteriology [M]. (9th Edn). USA Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994.
- [21] Padgett S R, Re D B, Gasser C S, et al.. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site [J]. J. Biol. Chem., 1991, 266(33):22364-22369.
- [22] Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttlesworth W A, et al..

- Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(4):1376-1380.
- [23] Selvapandian A, Bhatnagar R K. Isolation of a glyphosate-metabolising *Pseudomonas*: detection, partial purification and localisation of carbon-phosphorus lyase [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, 40(6): 876-882.
- [24] Griffin H G, Griffin A M. Cloning and DNA sequence analysis of the *serC-aroA* operon from *Salmonella gallinarum*; Evolutionary relationships between the prokaryotic and eukaryotic *aroA*-encoded enzymes [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, 137(1): 113-121.
- [25] Klimek M, Lejczak B, Kafarski P, *et al.*. Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum* [J]. *Pest Manage. Sci.*, 2001, 57(9): 815-821.
- [26] Tian Y S, Xiong A S, Xu J, *et al.*. Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a novel class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(17): 6001-6005.
- [27] 全鑫,周春雨,范婕妤,等.草甘膦高效降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2010, 47(4):921-925.
- Quan X, Zhou C Y, Fan J Y, *et al.*. Isolation, identification and characterization of a highly efficient glyphosate degrading strain [J]. *J. Sichuan Univ. (Nat. Sci.)*, 2010, 47(4): 921-925.
- [28] 刘攀.草甘膦对土壤微生态的影响及其抗性和降解真菌的研究[D].长春:吉林大学,硕士学位论文,2009.
- Liu P. Effects of glyphosate on the soil microecosystem and research of glyphosate-degradation and glyphosate-resistance fungi [D]. Changchun: Jilin University, Master Dissertation, 2009.
- [29] 刘柱,陈明,徐玉泉,等.一株草甘膦极端抗性菌株的分离和分子鉴定[J]. *高技术通讯*, 2002, (12): 25-28.
- Liu Z, Cheng M, Xu Y Q, *et al.*. Isolation and molecular identification of a extremely glyphosate-tolerant bacterial strain [J]. *Chin. High Technol. Lett.*, 2002, (12): 25-28.
- [30] 于海涛,金龙国,蒋凌雪,等.抗草甘膦真菌(*Candida palmioleophila*)分离鉴定及其 cDNA 文库构建[J]. *作物杂志*, 2012, (5): 48-53.
- Yu H T, Jin L G, Jiang L X, *et al.*. Isolation, identification and cDNA library construction of glyphosate-resistant Fungus (*Candida palmioleophila*) [J]. *Crops*, 2012, (5): 48-53.
- [31] Brandbury J F. Guide to Plant Pathogenic Baeteira [M]. CAB International Myeological Instiutte, 1986.
- [32] Dill G M. Glyphosate-resistant crops: History, status and future [J]. *Pest Manage. Sci.*, 2005, 61(3): 219-224.
- [33] Liu F, Cao Y P. Cloning and characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Pantoea* sp [J]. *Genet. Mol. Res.*, 2015, 14(4): 19233-19241.

(责任编辑:温小杰)