

张玉池,王晓蕾,徐文蓉,等. 国内外抗除草剂基因专利的分析[J]. 杂草学报 2017, 35(2): 1-22.

doi: 10.19588/j.issn.1003-935X.2017.02.001

## 国内外抗除草剂基因专利的分析

张玉池,王晓蕾,徐文蓉,刘琪,相世刚,戴伟民,强胜,宋小玲

(南京农业大学杂草研究室,江苏南京 210095)

**摘要:** 抗除草剂基因是培育抗除草剂转基因作物的基础。自1983年第1例抗草甘膦基因报道以来,到目前已经从微生物和植物中发掘出大量的抗性基因,并采用人工改造和基因融合的方法获得了新的抗性基因。本文归纳总结了国内外抗除草剂基因的专利,目的是为我国抗除草剂基因的发掘提供参考。经统计发现,国际上抗除草剂基因专利有52项,发掘的基因对草甘膦、草丁膦、磺酰脲类、溴苯腈、2,4-D、麦草畏、咪唑啉酮类、苯并咪唑啉类、吡啶甲酸酯类、原卟啉原氧化酶(PPO)抑制剂类、羟苯基丙酮酸加双氧酶(HPPD)抑制剂类、芳氧苯氧丙酸酯类(包括唑禾灵)和环己烯酮类13个种类除草剂有抗性。我国有48项专利,发掘的基因对草甘膦、草丁膦、咪唑啉酮类、磺酰脲类4个种类除草剂有抗性,且40项属于抗草甘膦基因。我国虽在专利数量上与国外相差不大,但在种类上远不及国外。因此,在我国抗除草剂基因的研究与开发方面面临着挑战。

**关键词:** 抗除草剂基因; 专利申请; 除草剂; 国内外差距; 发展策略

**中图分类号:** S451; D913.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-935X(2017)02-001-22

## Analysis on the Patents of Herbicide Resistance Gene at Home and Abroad

ZHANG Yu-chi, WANG Xiao-lei, XU Wen-rong, LIU Qi, XIANG Shi-gang,

DAI Wei-min, QIANG Sheng, SONG Xiao-ling

(Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Herbicide resistance genes are the basis for breeding herbicide-resistant transgenic crops. Since the first case of glyphosate-resistant gene was reported in 1983, a large number of resistance genes have been isolated from microbes and plants, and new resistance genes have been obtained by means of artificial modification and gene fusion. In order to provide information for developing herbicide-resistant genes domestically, it summarized the patent of herbicide-resistant gene at home and abroad. Through counting discovering, it was found that there were 52 herbicide-resistant gene patents at abroad, and the genes were resistant to 13 herbicides including glyphosate, glufosinate, sulfonylureas, bromoxynil, 2,4-D, dicamba, imidazolinones, benzofuran, pyridine formate, protoporphyrin oxidase (PPO) inhibitors, hydroxyl phenyl pyruvate plus dioxygenase (HPPD) inhibitors, aryloxy phenoxy propionates (quinoxaline) and cyclohexanediones. There are 48 herbicide-resistant gene patents in China, among which 40 belonged to glyphosate resistant gene. While the genes were resistant to 4 herbicides including the glyphosate, glufosinate, imidazolinones and sulfonylureas. Although the patent numbers had little disparity

收稿日期: 2017-05-10

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2016ZX08012005-006); 中国科学院学部咨询评议项目“我国杂草危害问题与对策”。

作者简介: 张玉池(1989—),男,山东人,硕士研究生,研究方向为转基因作物安全评估。E-mail: 1099564360@qq.com。

通信作者: 宋小玲,博士,教授,博士生导师,研究方向为转基因作物安全性评估。E-mail: sxl@njau.edu.cn。

at home and abroad, but the species were far less than foreign. Therefore, herbicide-resistance gene research and development was confronted with challenges in China.

**Key words:** herbicide-resistance gene; patents application; herbicide; the disparity at home and abroad; development strategy

早在20世纪70年代初期国际上就开始了转基因作物的研究,至今已经培育出多种转基因作物,涵盖了大部分粮食作物及经济作物,如水稻、玉米、棉花、烟草、番茄、辣椒、大豆、杨树等,目的基因大部分为抗除草剂、抗虫、抗病和抗逆等抗性基因,其中贡献最大的是抗除草剂基因。2016年全球单一抗除草剂转基因作物、抗虫/抗除草剂复合性状转基因作物分别占总转基因作物种植面积的47%和41%,因此抗除草剂转基因作物的总种植面积达到了88%<sup>[1]</sup>。抗除草剂转基因作物的种植不仅降低了杂草的防除成本,增加了作物产量,同时也减少了除草剂对当茬和后茬作物的残留药害,降低了环境污染<sup>[2-3]</sup>。但是,由于目前释放的抗除草剂转基因作物主要是对草甘膦的抗性,抗除草剂的单一化,使得田间杂草对草甘膦产生了抗性<sup>[4]</sup>。自从1996年在澳大利亚出现抗草甘膦的硬直黑麦草(*Lolium rigidum*)后,全球草甘膦杂草抗药性物种逐年增加。据统计,到2017年已有26个国家共计37种杂草对草甘膦产生了抗药性。为了避免除草剂单一化的问题,人们一直在发掘不同类型的抗除草剂基因。下面从抗除草剂基因的国际专利和我国拥有自主知识产权的专利2个方面解析抗除草剂基因专利的申请情况,目的是为我国抗除草剂基因的发掘提供参考。

## 1 抗除草剂基因的专利申请概况

通过查询佰腾专利网站(<http://so.baiten.cn/Index/Index>)整理得到了国际和国内抗除草剂的专利申请情况。目前抗除草剂基因申请保护的专利主要有52项;国内核心专利主要有48项。下面分别对国际和国内的抗除草剂基因专利申请状况进行分析。

### 1.1 国际专利中的抗除草剂基因

1.1.1 自然来源的抗除草剂基因 从自然界生物中获得的抗除草剂基因主要对草甘膦、草丁膦、

磺酰脲类、溴苯腈、2,4-D、麦草畏、咪唑啉酮类、苯并咪唑类、吡啶甲酸酯类、原卟啉原氧化酶(PPO)抑制剂类、羟苯基丙酮酸加双氧酶(HPPD)抑制剂类、芳氧苯氧丙酸酯类(包括喹禾灵)和环己烯酮类共13个种类的除草剂有抗性(表1)。

抗草甘膦基因主要有3类,第一类是5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸(EPSP)合酶基因。5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)是叶绿体中的一种酶,它能催化芳香族氨基酸的合成,而草甘膦能竞争性抑制EPSPS的作用,导致叶绿体类囊体薄膜上的蛋白质合成受阻,使得叶绿体的结构受损,从而致使功能受损。具有草甘膦耐性的EPSP合酶有3个类型:Class I、Class II和Class III。美国孟山都公司(Monsanto Company US)从鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* strain TA831)克隆获得了编码EPSP合酶的*aroA*基因,编码的氨基酸能够合成5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(Class I 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthetase),此酶与草甘膦的亲合力低,产生对草甘膦的抗性<sup>[5]</sup>。Barry等从根癌农杆菌CP4、无色杆菌(*Achromobacter* strain LBAA)、假单胞菌PG2982(*Pseudomonas* strain PG2982)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)克隆了Class II EPSPS基因,此类基因能够降低作物对草甘膦的亲合力,使作物对草甘膦具有更高的耐受性<sup>[6]</sup>。埃森尼克斯生物技术公司(Athenix Corporation)从肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、根癌农杆菌、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)中克隆获得一系列新的EPSPS基因,属于Class III型,此类基因编码的氨基酸合成的Class III 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(Class III 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthetase)与草甘膦的亲合力低而具有耐草甘膦的特性<sup>[7]</sup>。第二类是草甘膦降解酶基因。伦敦威斯康星大学帝国化学学院[Impe-

rial Chemical House, Millbank, London SW1P 3JF (GB) ] 从木糖氧化产碱菌 (*Alcaligenes xylooxidans*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 中克隆出新的降解草甘膦的基因, 此类基因被分别命名为 SC9 基因和 SC11 基因<sup>[8]</sup>。美国孟山都公司 (Monsanto Company US) 从人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropi* strain LBAA) 中发现了草甘膦氧化还原酶基因 (*gox*)。这些基因可以表达降解草甘膦的蛋白酶, 使草甘膦的 C—N 键断裂生成氨基磷酸 (AMPA) 和乙醛酸盐<sup>[9]</sup>。第三类是草甘膦—N—乙酰转移酶基因 (*gat*)。先锋种子子公司 (Pioneer Hi-Bred Int'l.) 从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中克隆出了 *gat*, 该基因编码草甘膦 N—乙酰转移酶 (glyphosate—N—acetyltransferase, GLYAT), 该酶能够将羧基基团从 CoA 转移到草甘膦的 N 端, 使草甘膦失活<sup>[10]</sup>。

抗草丁膦基因主要有 2 类: 第一类是具有草丁膦解毒作用的 N—乙酰转移酶 (PAT) 基因 *pat*。拜耳科学作物公司 (Bayer Crop Science) 分别从吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 和绿色链霉菌 (*Streptomyces viridochromo*) 中克隆获得能编码 PAT 的基因 *bar* 和 *pat*<sup>[11]</sup>。另一类是谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 基因, 此酶可以过表达谷氨酰胺, 从而实现对草丁膦的耐性。美国马萨诸塞州 Hospital Corporation 公司 [The General Hospital Corporation (Boston, MA)] 从突变的首蓿 (*Medicago sativa*) 中分离出了基因 *gs*, 将此基因导入水稻、玉米、小麦等作物中后, 转基因 *gs* 能够表达谷氨酰胺合成酶, 此酶能有效解除草丁膦的毒性, 从而使作物拥有抗草丁膦的特性<sup>[12]</sup>。

此外, 美国陶氏益农公司 (Dow AgroScience LLC) 从蓝色链霉菌 A3 中克隆出基因 *dsm-2* (*dsm-2* 和 *pat* 有 30% 的同源性, 和 *bar* 有 28% 的同源性), 其表达的 DSM-2 蛋白对膦丝菌素和双丙氨酸具有耐受性, 可以提高植株对草丁膦的耐性。以 CSVMV 或 AtUbi10 作为启动子, 构建了 DSM-2 的质粒载体, 成功转入了油菜、大豆及具有抗虫性的烟草和玉米中, 使其同时拥有了对草丁膦的耐性<sup>[13]</sup>。

原卟啉原氧化酶 (protoporphyrinogen oxidase,

PPO) 是原卟啉 IX 生物合成的关键酶, 是血红素和叶绿素相同生物合成通路上最后 1 个共有酶, 它催化原卟啉原 IX 氧化为高度共轭的原卟啉 IX。原卟啉原氧化酶抑制剂基因 (PPX) 能够防止除草剂与 PPO 稳定结合, 以获得作物对原卟啉原氧化酶抑制性除草剂的抗性。美国 Cibus 有限责任公司 (Cibus US LLC) 从一些植物的突变体中发现了突变型原卟啉原 IX (protoporphyrinogen IX, PPX) 基因, 包括来自于突变型拟南芥、长芒苋 (*Amaranthus palmeri*)、水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、玉米 (*Zea mays*)、大豆 (*Glycine max*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、蓖麻 (*Ricinus communis*) 和油菜 (*B. napus*) 线粒体内的 PPX 基因, 导入这些基因的植株可编码突变的 PPX 蛋白, 从而使目的植株对 PPX 抑制剂类除草剂 (苯并咪唑酮类、氟磺胺草醚、乙氧氟草醚、三氟羧草醚和二苯醚类) 有抗性<sup>[14]</sup>。德国巴斯夫公司 (BASF SE) 发现了一系列微生物来源和植物来源的野生型或变异型编码 PPO 的基因, 包括: 苋属 (*Amaranthus*) 的 PPX2L WC、PPX2L AC、PPX2L CC R、PPX2L AC R 和 PPX2, 拟南芥的 PPX 和 PPOX, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的 *ppxl* 和 *ppxl*, 菊苣 (*Cichorium intybus*) 的 PPX1, 菠菜 (*Spinacia oleracea*) 的 SO-POX2 和 SO-POX1, 高粱 (*Sorghum bicolor*) 的 Hyp. Protein, 以及茄属 (*Solanum*) 的 PPOX, 玉蜀黍属 (*Zea*) 的 ZM BFc0091803 和 *prpo2*, 衣藻属 (*Chlamydomonas*) 的 *Ppx1*, 稻属 (*Oryza*) 的 PPOX1 和 Hyp. Protein, 大豆属 (*Glycine*) 的 *hemG* 和黄瓜属 (*Cucumis*) 的 *CsPPO*。这些基因可使植物对 PPX 抑制剂类除草剂 (苯并咪唑酮类) 除草剂具有抗性或耐性<sup>[15]</sup>。

抗 2,4-D 的基因主要有 2 种: 一种基因编码的氨基酸能够合成甲基转移酶, 如田纳西大学发现了抗 2,4-D 的基因 *PtJBMT3*, 此基因编码的甲基转移酶能够使 2,4-D 失活<sup>[16]</sup>; 另一种基因编码的氨基酸能够合成芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD), 如美国陶氏益农公司从细菌中发现的 *aad-1*、*aad-13* 和 *aad-12*。美国陶氏益农公司 (Dow AgroSciences LLC) 从鞘氨醇单胞菌 (*Sphingobium herbicidovorans*) 中克隆获得了耐 2,4-D 的

基因,命名为 *aad-1*。该基因编码的氨基酸能够合成芳氧基链烷酸酯双加氧酶(AAD-1),此酶可以降解 2,4-D 的侧链和芳氧苯氧丙酸酯类除草剂的右旋异构体。将该基因插入玉米基因组的特定位点,即事件 DAS-40278-9(pDAS1740),获得的转基因玉米对除草剂 2,4-D 和喹禾灵有抗性。该公司从鞘氨醇单胞菌中克隆获得了另一个基因,命名为 *aad-13*。该基因编码的氨基酸能够合成芳氧基链烷酸酯双加氧酶 AAD-13(Aryloxyalkanoate dioxygenase, AAD-13),此酶可降解 2,4-D 类和吡啶氧乙酸类的除草剂<sup>[17]</sup>。美国陶氏益农公司(Dow AgroSciences LLC)从食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*)中克隆出另一个基因,并命名为 *aad-12*。该基因编码的芳氧基链烷酸酯双加氧酶 AAD-12 可催化降解 2,4-D 的侧链,转入该基因的植物不仅对除草剂 2,4-D 有抗性,对吡啶氧乙酸酯除草剂(氯氟吡氧乙酸、三氯吡氧乙酸等)也有抗性<sup>[18]</sup>。

羟苯基丙酮酸加双氧酶(hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase, HPPD)能催化植物体内质体醌与生育酚合成的起始反应,即催化对羟基丙酮酸转化为尿黑酸,这些尿黑酸经过羧化、聚戊二烯基化和烷基化生成质体醌和生育酚。而 HPPD 抑制剂类除草剂(包括吡唑酮类、三酮类、二苯酮类、二酮腈类和异噁唑酮类)通过抑制 HPPD,导致质体醌和生育酚含量减少,植物体发生白化,并最终死亡。德国巴斯夫公司发现了一些来自野生型或自然突变型的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的抗苯并咪唑类除草剂的核酸序列,这些核酸序列编码 HPPD 或尿黑酸茄尼酯转移酶(homogentisate solanesyl transferase, HST)。插入这些基因的作物可以过表达 HPPD,从而获得对 HPPD 抑制剂类除草剂的抗性。该公司还从弗兰克氏菌属(*Frankia*)和自然突变的植物(拟南芥和向日葵等)中发现了对 HPPD 抑制剂类除草剂(吡唑酮类、三酮类和异噁唑酮类)有抗性的自然突变核苷酸序列,这种序列表达的 HPPD,使植物获得对 HPPD 抑制剂类除草剂更强的耐受性<sup>[19]</sup>。德国拜耳公司(Bayer CropScience AG)从赤霉菌(*Kordia algicida*)中克隆出对 HPPD

抑制剂类除草剂有抗性的基因,命名为 *FMP27*,此基因编码的氨基酸能合成 FMP27 HPPD 蛋白,以 *FMP27* 基因构建载体 pSE420-FMP27e,并成功导入烟草中,使之具有对 HPPD 抑制剂类除草剂的耐性<sup>[20]</sup>。

除上述 5 类除草剂的抗性基因外,还发现了对其他类型除草剂有抗性的基因。美国孟山都公司(Monsanto Company)从嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6)中克隆获得 *dmo* 基因,该基因编码合成的麦草畏单加氧酶(di-camba mono-oxygenase enzyme),该酶以麦草畏为底物产生氧化反应,实现了对麦草畏的抗性。将该基因导入烟草核基因组中后可增强其对麦草畏的抗性,若导入烟草叶绿体基因组中则会使含有基因 *dmo* 的转基因烟草对麦草畏的抗性更强<sup>[21]</sup>。美国陶氏益农公司(Dow AgroSciences LLC)发现一系列具有抗吡啶甲酸酯类除草剂的基因,包括来自拟南芥的 *AFB5*、*AFB4* 和 *SGT1b*,以及 *AFB5* 的 3 个同源核酸序列,其中 2 个来自水稻(*Oryza sativa*),1 个来自颤杨(*Populus tremula* × *Populus tremuloides*)。这些基因编码合成的蛋白质为吡啶甲酸酯生长素的结合物和受体,因此这些抗除草剂基因使作物对吡啶甲酸酯类除草剂具有抗性<sup>[22]</sup>。

杭州瑞丰科技公司从狗牙根(*Cynodon dactylon*)中克隆出了除草剂解毒基因 *N-Z1*。该基因属于细胞色素 P450 基因家族,对以下 1 至多种除草剂具有抗性,这些除草剂分属于:乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂类除草剂;原卟啉原氧化酶(PPO)抑制剂类除草剂;对羟苯基丙酮酸盐双氧化酶(HPPD)抑制剂类除草剂;光系统 II 抑制剂型除草剂;合成生长素类除草剂等。将 *N-Z1* 的 5' 端与玉米的 ubiquitin-1 启动子(ZmUbi-1)连接,同时在 3' 端与 1 个 CaMV 的 35S 终止子连接,形成可以在植物中表达的开放阅读框,并以此构建 T-DNA 载体 pCam1300-N-Z1,通过农杆菌转化法成功将该基因导入到水稻,使其获得对烟嘧磺隆和硝磺草酮的抗性<sup>[23]</sup>。

1.1.2 人工诱变获得的抗除草剂基因 人工诱变也叫人工引变,是指利用物理因素(X 射线、γ 射线、紫外线、激光等)或化学诱变(如叠氮化钠、乙

基甲磺酸等)来处理植物,使植物发生基因突变。这种方法可提高突变率,创造人们需要的变异类型。

科罗拉多小麦研究基金有限公司(Colorado Wheat Research Foundation Limited)通过乙烷磺酸甲酯(EMS)诱变小麦种子,筛选出对乙酰辅酶A羧化酶(ACCase)抑制剂类除草剂具有抗性的小麦突变体AF28-A、AF26-B和AF10-D,将它们的相应基因编码的ACCase氨基酸序列与黑草(*Buchnera cruciata*)进行对比,发现其第2004位的丙氨酸被缬氨酸取代。用这类突变小麦通过传统育种方法可获得具有抗芳氧苯氧丙酸酯类或环己烯酮类除草剂的小麦个体<sup>[24]</sup>。

维多利亚农业服务有限公司(Agriculture Victoria Services Pty Ltd)通过叠氮化钠(AZ)和甲基亚硝脒(MNU)对大约10000粒水稻种子进行突变诱导,筛选出4株对喹禾灵具有抗性的水稻植株,通过对这4株突变体的核酸及蛋白的序列分析结果发现,其中1株水稻突变体在ACCase编码区的羧基转移酶区域存在1个碱基位点的突变,其第2096个氨基酸位点由GGC突变为AGC,氨基酸由原来的甘氨酸转变为丝氨酸。该抗性机理与抗喹禾灵的黑草相似,抗喹禾灵的黑草是第2096个氨基酸由甘氨酸转变为了丙氨酸。其他3株抗性水稻未见此类突变,抗性机制尚不明确<sup>[25]</sup>。该公司还通过乙基甲磺酸(ethyl methane sulfonate,简称EMS)化学诱变大麦种子,筛选出抗咪唑啉酮类除草剂的种子,从这些抗性种子中获得编码乙酰乳酸合成酶(AHAS,也被称为ALS)的核酸序列,命名为VBHT0805、VBHT0806、VBHT0802和VBHT0810,核酸比对结果显示,这些序列与抗咪唑啉酮类除草剂基因AHAS *Houlgare AF059600*完全一致或只存在1个碱基位点的变化<sup>[26]</sup>。

1.1.3 人工改造获得的抗除草剂基因 为了提高优化植物抗除草剂的能力,在发现的抗除草剂基因的基础上,人们通过基因定点突变和密码子改造方法获得了具有对同种及多种除草剂有耐性的基因(表2)。

通过基因定点突变获得的除草剂基因如下,美国Incima有限责任公司和美国西布斯有限责任

公司(Incima US LLC和Cibus US LLC)发明了一种获得非转基因耐草甘膦植物的新方法。该方法利用重组寡核糖小体,在基因EPSPS编码区定点突变,使得序列编码的氨基酸发生1至多个改变,合成的蛋白对草甘膦等氨基甘氨酸类除草剂有抗性。最后通过基因枪法将该突变的重组寡核糖小体导入到植物中,获得拥有抗氨基甘氨酸类除草剂的抗除草剂植株。现已成功应用于玉米、水稻、油菜等植物中。先正达公司(Syngenta AG)对来自大肠杆菌的Class I EPSPS基因(*aroA*基因)进行人工修饰,使其编码的氨基酸序列的第8、68、101和102位点的氨基酸有2~3个被其他氨基酸替换,这种新蛋白对草甘膦具有抗性<sup>[27]</sup>。美国孟山都公司(Monsanto Company)对抗草甘膦基因*epsps*进行人工修饰,获得了抗草甘膦基因*mepsps*编码的5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶(mEP-SPS),能产生芳香族氨基酸,对草甘膦具有耐受性;*mepsps*基因已成功导入了玉米中<sup>[28]</sup>。

阿格拉公司(Agragen Inc)对来自拟南芥的乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase,ALS)基因进行人工修饰,获得变异型的A122、P197和W574基因,它们编码的ALS蛋白序列分别在第122位、197位和574位发生了改变,其原先的丙氨酸、脯氨酸和色氨酸被其他氨基酸取代。这种新型蛋白与磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂结合较弱,亲和力较低。若直接以基因*als*本身的启动子构建载体导入植物,在无除草剂压力的情况下,基因*als*不能正常表达;而以35S启动子和TATA启动子替代基因*als*本身的启动子,构建载体获得的转基因芥蓝(*B. oleracea*)具有磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂抗性,且在无除草剂压力的情况下,仍能正常表达ALS<sup>[29]</sup>。德国拜耳公司(Bayer CropScience AG)对来自拟南芥和烟草的ALS蛋白基因进行定点突变,使得ALS蛋白基因编码的氨基酸序列上的第569位的色氨酸被亮氨酸替代,第188位的脯氨酸被丝氨酸替代。将定点突变的*als*基因导入甜菜中,筛选获得对磺酰脲、咪唑啉酮及嘧啶基(硫代)苯甲酸酯类除草剂有耐性的转基因甜菜<sup>[30]</sup>。

巴斯夫公司对来自拟南芥的乙酰乳酸合成酶

表 1 摇国际抗除草剂基因核心专利情况

Table 1 摇A review of the key patents for herbicide – resistant genes

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间 (年-月-日)	转入的植物或用途
<i>aroA</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 Class I	鼠伤寒沙门氏菌 TA831 ( <i>Salmonella typhimurium</i> strain TA831)	草甘膦	<i>aroA</i> 基因产生的 EPSPS 对草甘膦亲和力降低	孟山都卡尔加内公司	美国	西欧、日本、中国、加拿大、美国等	1983-01-05	烟草 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )、大豆 ( <i>Glycine max</i> )、玉米 ( <i>Zea mays</i> )、油菜 ( <i>Brassica napus</i> )、苜蓿 ( <i>Medicago sativa</i> ) 大豆、油菜
<i>CP4 - epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 Class II	根癌农杆菌 CP4 ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4)	草甘膦	<i>CP4 - epsps</i> 基因产生的 EPSPS 对草甘膦亲和力降低	孟山都公司	美国	西欧、澳大利亚、加拿大、日本、美国等	1991-08-28	大豆、棉花 ( <i>Gossypium hirsutum</i> )、玉米、油菜、烟草
<i>epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 Class II	根癌农杆菌 CP4、无色杆菌 LBAA ( <i>Achromobacter</i> LBAA)、假单胞菌 PG2982 ( <i>Pseudomonas</i> strain PG2982)、枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )、金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	草甘膦	被转入这些 Class II EPSPS 基因的植物所表达的 EPSP 合酶可以与叶绿体转运多肽 (CTP) 结合, 从而被转运至叶绿体靶标, 使植物获得对草甘膦的抗性	杰拉德·弗朗西斯·巴里 (人名)	美国	美国	1999-12-16	大豆、棉花 ( <i>Gossypium hirsutum</i> )、玉米、油菜、烟草
<i>epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶	恶臭假单胞菌 ( <i>Pseudomonas putida</i> )	草甘膦	<i>epsps</i> 基因产生的 EPSPS 对草甘膦亲和力降低	北京大学	中国	中国、美国等	2002-05-28	
<i>epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 Class III	肺炎克雷伯氏菌 ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )、根癌农杆菌、丁香假单胞菌	草甘膦	<i>epsps</i> 基因产生的 EPSPS 对草甘膦亲和力降低	埃森尼克斯生物技术公司	美国	西欧、日本、中国、加拿大、美国	2006-04-07	玉米、水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )、小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> )、棉花、大豆
<i>epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶	牛筋草 ( <i>Eleusine indica</i> )	草甘膦	<i>epsps</i> 基因产生的 EPSPS 对草甘膦亲和力降低	孟山都公司	美国	西欧、日本、加拿大、美国等	2004-10-12	玉米、小麦
<i>gox</i>	草甘膦氧化还原酶基因	无色杆菌 LBAA	草甘膦	降解草甘膦	孟山都公司	美国	西欧、美国等	1991-06-24	油菜
<i>gat</i>	新型谷氨酸-N-乙酰基转移酶	地衣芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	草甘膦	能催化1个转乙酰基的反应, 将草甘膦代谢成低毒的乙酰草甘膦, 使其失活, 从而实现对草甘膦的降解	先锋国际种子子公司	国际专利	国际专利	2003-04-30	
<i>gat</i>	草甘膦-N-乙酰转移酶	枯草芽孢杆菌	草甘膦	脱毒	先锋国际种子子公司	美国	西欧、日本、中国、加拿大、美国等	2003-04-29	棉花、玉米、大豆
<i>SC9</i> 和 <i>SC11</i>	草甘膦降解蛋白酶	木糖氧化产碱菌 ( <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> )、假单胞菌菌株	草甘膦	C-N 键断裂, 使草甘膦降解	伦敦威斯康星大学	英国	国际专利	1992-04-27	

Table 1 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间 (年-月-日)	转入的植物或用途
<i>Gld</i>	草甘膦降解酶	苜蓿根瘤菌 ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )	草甘膦	分解	中山大学	中国	中国	2001-06-19	
<i>Bar</i> (Bialaphos resistance gene)	PPT 乙酰转移酶 (PAT)	吸水链霉菌 ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> )	草丁膦	乙酰化解毒	拜耳作物科学有限公司	德国	西欧、澳大利亚、东欧、巴西、日本等	1986-03-11	水稻、玉米、小麦
<i>Sfr</i> (Bialaphos and phosphinothricin resistance gene)	PPT 乙酰转移酶 (PAT)	吸水链霉菌	草丁膦	乙酰化解毒	植物遗传公司	美国	澳大利亚、贝宁、巴西、中非共和国、刚果、丹麦、芬兰、加蓬、匈牙利、日本、韩国、马里、挪威、塞内加尔、乍得、多哥、美国等	1986-11-03	水稻、玉米、小麦
<i>gs</i>	谷氨酰胺合成酶	苜蓿 ( <i>Medicago sativa</i> )	草丁膦	突变	总医院公司 (马萨诸塞州波士顿)	美国	美国	1987-02-04	水稻、玉米、小麦
<i>gdhA</i>	谷氨酰胺脱氢酶	大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	草丁膦	耐性	南伊利诺伊大学理事会	美国	美国	1997-07-01	烟草、玉米
<i>DSM-2</i>	DSM-2 蛋白	蓝色链霉菌 A3 ( <i>Streptomyces coelicolor</i> A3)	草甘膦、草丁膦 2,4-D 及耐虫性	耐性	陶氏农业科学有限责任公司	国际专利	国际专利	2008-11-06	油菜、大豆、烟草、玉米
<i>Ilv2</i>	乙酰乳酸合成酶	啤酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	磺酰脲类	突变	杜邦公司	美国	西欧、澳大利亚、巴巴多斯、布基纳法索、贝宁、巴西、中非共和国、刚果、喀麦隆、日本、美国等	1984-02-24	烟草
<i>P450 N-Z1</i>	乙酰乳酸合酶 细胞色素 P450	水稻 狗牙根 ( <i>Cynodon dactylon</i> )	磺酰脲类 (烟嘧磺隆、硝磺草酮等)	突变 解毒	浙江大学 杭州瑞丰生物科技有限公司	中国 国际专利	中国 国际专利	2007-04-26 2011-11-16	水稻 水稻、拟南芥
<i>SuRB - Hra</i>	乙酰乳酸合成酶	烟草	磺酰脲类	突变	杜邦公司	美国	西欧、澳大利亚、巴巴多斯、布基纳法索、贝宁、巴西、中非共和国、刚果、喀麦隆、日本、美国等	1988-03-04	烟草

Table 1 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间 (年-月-日)	转入的植物或用途
<i>bxn</i>	脲水解酶	肺炎克雷伯氏菌	溴苯腈	脱毒	罗纳普朗克	法国	西欧、澳大利亚、巴西、日本、韩国、罗马尼亚、美国等	1987-07-08	番茄 ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )、棉花
<i>aad-1</i>	芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD-1)	鞘氨醇单胞菌 ( <i>Sphingobium herbicidovorans</i> )	2,4-D 和芳氧基丙酸酯 (如 喹禾灵) 类除草剂	C-P 键断裂, 降解除草剂侧链和芳氧基丙酸酯除草剂的 R-对映异构体	美国陶氏益农有限责任公司	国际专利	国际专利	2010-08-18	玉米
<i>aad-13</i>	芳氧基链烷酸酯双加氧酶 AAD-13	鞘氨醇单胞菌	2,4-D、吡啶氧乙酸	C-P 键断裂降解除草剂	美国陶氏益农有限责任公司	美国	美国、日本	2012-10-02	
<i>aad-12</i>	芳氧基链烷酸酯双加氧酶 AAD-12	食酸丛毛单胞菌 ( <i>Delfia acidovorans</i> )	2,4-D、吡啶氧乙酸	C-P 键断裂使其侧链降解从而降解除草剂	美国陶氏益农有限责任公司	美国	美国、日本	2012-10-08	烟草、大豆、玉米、油菜、棉花、水稻
<i>tydA</i>	2,4-D 单氧化酶	产碱杆菌 ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> ) 植物	2,4-D	增强抗性	先灵公司	德国	西欧、日本、美国等	1987-08-28	棉花
<i>PtJBM73</i>	甲基转移酶	植物	2,4-D、生长素类除草剂	抗性	田纳西大学 研究基金会	美国	美国	2012-12-09	
<i>Hem G</i>	原卟啉原氧化酶	大肠杆菌	原卟啉原氧化酶抑制剂	突变	瑞士汽巴·嘉基公司	瑞士、法国	西欧、东欧、澳大利亚、巴西、加拿大、中国、美国、日本等 74 个国家	1995-08-06	烟草
<i>Protex</i>	原卟啉原氧化酶	大豆、小麦、棉花、甜菜 ( <i>Beta vulgaris</i> )、油菜、水稻、高粱、甘蔗 ( <i>Saccharum officinarum</i> )	原卟啉原氧化酶抑制剂	突变	先正达公司	瑞士	西欧、东欧、加拿大、中国、美国、日本等	2000-06-30	
<i>Protex</i>	原卟啉原氧化酶	集胞藻 ( <i>Synechocystis</i> )	原卟啉原氧化酶抑制剂	突变	日本曹达株式会社	日本	西欧、加拿大、中国、美国、日本等	2006-09-25	
变异型基因	原卟啉原 IX 氧化酶 原卟啉原氧化酶	拟南芥、长芒苋 ( <i>Amaranthus tuberculatus</i> )、水稻、高粱、玉米、大豆、马铃薯 ( <i>Solanum tuberosum</i> )、蓖麻 ( <i>Ricinus communis</i> )、油菜	PPX 抑制型 除草剂抗性	抗性	西布斯特美国 有限责任公司	美国	美国	2011-09-28	



摇Table 1 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间 (年-月-日)	转入的植物或用途
编码 PPO 的基因	原卟啉原氧化酶 (PPO)	苋属、拟南芥、烟草、菜茵衣藻 ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	苯并恶唑酮类除草剂	抗性	德国巴斯夫有限公司	国际专利	阿拉伯联合酋长国、阿尔巴尼亚、安提瓜和巴布达、亚美尼亚、波黑、奥地利	2011-12-15	
编码 PPO 的基因	原卟啉原氧化酶 (PPO)	大肠杆菌、枯草杆菌	抑制原卟啉原氧化酶 (PPO) 类除草剂	抗性	德国巴斯夫 (中国) 有限公司	国际专利	国际专利	2014-12-17	烟草、大豆、玉米、油菜、
编码 GST 的基因	谷胱甘肽转移酶	玉米	氯代乙酰胺	解毒	杜邦公司	美国	西欧	2000-10-02	玉米、大豆、番茄
<i>dmo</i>	麦草畏单加氧酶	嗜麦芽窄食单胞菌 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain DI-6)	麦草畏	麦草畏单加氧酶将麦草畏作为底物发生酶反应, 将其降解为无毒的 3,6-二氯水杨酸 (3,6-DCSA) 从而赋予除草剂耐受性	孟山都科技有限责任公司	美国	美国	2007-06-06	烟草
编码 HPPD 和 HST 的基因	羟苯基丙酮酸加双氧酶、尿黑酸茄尼酯转移酶	拟南芥、菜茵衣藻	苯并咪唑类	抗性	德国巴斯夫有限公司	国际专利	阿拉伯联合酋长国、阿尔巴尼亚、安提瓜和巴布达、亚美尼亚、波黑、奥地利	2011-05-02	
<i>FMP27</i>	羟苯基丙酮酸双加氧酶 FMP27 HP-PD	赤霉菌 ( <i>Kortia algicida</i> )	HPPD 抑制剂类除草剂	抗性	拜耳作物科学公司	美国	美国	2014-10-10	烟草、玉米
编码 HPPD 的基因	4-羟苯基丙酮酸双加氧酶 HPPD	拟南芥、向日葵 ( <i>Helianthus annuus</i> )、大麦 ( <i>Hordeum vulgare</i> )、斜生栅藻 ( <i>Scenedesmus obliquus</i> )、地嗜皮菌 ( <i>Geodermatophilus obscurus</i> )	HPPD 抑制剂类除草剂 (吡唑啉类、三唑啉和异噁唑啉)	抗性	德国巴斯夫有限公司	国际专利	国际专利	2016-02-10	
<i>als</i>	乙酰乳酸合成酶	拟南芥、烟草	磺酰脲、咪唑啉酮类除草剂	突变	拜耳作物科学公司	德国	国际专利	2013-12-10	甜菜
<i>AFB5</i> 、 <i>AFB4</i> 、 <i>SGT1b</i>	吡啶甲酸酯生长素的结合物和受体	来自拟南芥的 AFB5、AFB4 和 SGT1b, 及与 AFB5 同源的 3 个核苷序列, 其中 2 个来自水稻、1 个来自颤杨 ( <i>Populus tremula</i> × <i>Populus tremuloides</i> )	吡啶甲酸酯类除草剂	自然突变	美国陶氏益农有限公司	美国	美国	2011-11-23	

摇Table 1 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间 (年-月-日)	转入的植物或用途
编码 ACCase 的基因	乙酰辅酶 A 羧化酶	小麦突变体 AF28 - A, AF26 - B 和 AF10 - D	芳氧苯氧丙酮酯类、环己二酮类除草剂	乙烷磺酸甲酯 (EMS) 诱变	科罗拉多小麦研究基金会有限公司	国际专利	奥地利、比利时、瑞士、德国、法国、英国、日本、卢森堡、荷兰、瑞典、中国等	2012 - 01 - 31	小麦
编码 cetyl - CoA 的基因	乙酰辅酶 A 羧化酶	水稻突变体	唑禾灵等	人工诱变	美国水稻技术公司	国际专利	奥地利、比利时、瑞士、德国、法国、英国、日本、卢森堡、荷兰、瑞典、中国、等	2012 - 07 - 20	水稻
核苷酸序列 VBHT0805、VBHT0806、VBHT0802 和 VBHT0810	乙酰乳酸合成酶 AHAS 也被称为 ALS	诱变	咪唑啉酮类除草剂	抗性	维多利亚农业服务有限公司	美国	美国	2014 - 11 - 13	大麦

表 2 摇人工改造获得的抗除草剂基因

Table 2摇A review of the artificial transformation for herbicide - resistant genes

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间	转入的植物或用途
<i>gm - hra</i>	修改的乙酰乳酸合成酶 (ALS)	大豆	磺酰脲类	耐受性	Anthony J. Kinney, Keven L. Stecca	美国	美国	2007 - 10 - 30	大豆
<i>epsps</i>	5 - 烯醇丙酮莽草酸 - 3 - 磷酸合酶	<i>EPSPS</i> 基因定点突变	草甘膦	定点突变	美国 Incima 有限公司和美国西布斯有限责任公司	美国	美国	2012 - 09 - 17	水稻、油菜、玉米
<i>MC2 - EPSPS</i>	5 - 烯醇丙酮莽草酸小磷酸合成酶 (EPSPS) 融合蛋白 MC2 - EPSPS	大肠杆菌、农杆菌	草甘膦	密码子改造	创世纪种业有限公司	中国	国际专利	2013 - 08 - 26	棉花、烟草
<i>aroA</i>	新的 EPSPS 酶	大肠杆菌	草甘膦	多点突变耐受性	先正达公司	国际专利	国际专利	2014 - 02 - 06	玉米、烟草、大豆
ALS 突变基因 AI22、P197 和 W574	ALS 蛋白	拟南芥	磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂	密码子改造	埃及杜邦德涅穆斯和威尔明顿公司	美国	美国	2011 - 10 - 05	芥蓝 ( <i>Camelina sativa</i> )
P450	细胞色素 P450	来自玉米的 <i>CYP72A1</i> 和 <i>nsfl</i> , 水稻的 <i>CYP81A6</i>	HPPD 抑制剂类除草剂	人工修饰	先正达公司	美国	美国、日本	2011 - 12 - 12	大豆

大亚基(ahasl)基因 *Csr1-2* 进行点突变,将第653位的丝氨酸残基改为天冬氨酸(S653N),获得了具有抗咪唑啉酮类除草剂的基因 *Csr1-2*。改变后的乙酰乳酸合成酶不会与咪唑啉酮结合,从而保证了植物体内正常生理功能。将 *Csr1-2* 基因导入大豆中,获得抗咪唑啉酮类除草剂的转基因大豆<sup>[31]</sup>。Gioia等从大豆(*Glycine max*)中克隆获得1个新基因,命名为 *gm-hra*,对该基因进行人工修饰,编码的氨基酸合成的ALS具有耐磺酰脲类除草剂的特性。构建载体 PHP17752-*gm-hra* 并导入大豆中,获得耐磺酰脲类除草剂的大豆<sup>[32]</sup>。

先正达公司(Syngenta AG)对来自玉米的 *CYP72A1* 和 *nsfl* 基因,来自水稻的 *CYP81A6* 基因进行定点突变,这些人工改造过的P450家族基因编码的氨基酸所合成的细胞色素P450对HPPD抑制剂类除草剂有降解作用,将这些修饰后的P450基因导入植物中后,可使植物体过表达细胞色素P450,增强对HPPD抑制剂类除草剂的耐性<sup>[33]</sup>。

通过密码子改造获得的抗除草剂基因如下,中国创世纪种业有限公司对EPSPS蛋白MC-EPSPS和G2-*aroA*(中国专利03826892.2)的氨基酸序列进行同源对比分析,采用蛋白质工程和基因工程相结合的技术,在MC-EPSPS蛋白的N端融合了G2-*aroA*蛋白N端的26个氨基酸残基,获得了1个EPSPS突变体融合蛋白(MC2-EPSPS),该蛋白与草甘膦的亲合力较低,从而具有草甘膦抗性。通过原核表达及转基因植物功能鉴定发现,MC2-EPSPS的抗草甘膦水平较MC-EPSPS和G2-*aroA*均有显著提高<sup>[34]</sup>。Han等根据能够表达EPSP合酶的G2-*aroA*(来源于荧光假单胞菌 *pseudomonas fluorescens* G2)基因编码的氨基酸序列,在保证氨基酸序列不变的前提下,首先采用玉米偏好密码子,尽量避免使用玉米稀有密码子,对G2-*aroA*基因进行人工优化改造。在此基础上,去除DNA序列中造成植物基因转录不稳定的核酸序列,并去除发夹结构,得到密码子优化型抗草甘膦基因,将其命名为 *mG2-aroA*,此序列与G2-*aroA*有84%的同源性,而G+C含量由原来的64.83%降低到62.07%。以此构建携带有

*mG2-aroA*基因的重组表达载体 pS3300-UMG2,并导入玉米中,获得能够高表达G2-*aroA*蛋白(属于EPSPS酶)的转基因玉米,从而使其具有对草甘膦的抗性<sup>[35]</sup>。

此外,美国孟山都公司(Monsanto Technology LLC)人工合成了1个与来自根癌农杆菌CP4(*Agrobacterium tumefaciens* CP4)的 *cp4-epsps* 具有相同功能的基因,命名为 *trans*。该基因表达的EPSP合酶能够降低作物对草甘膦的亲合力。将其构建载体,并成功插入甘蓝型油菜(*B. napus*)A基因组的N4连锁群中,获得了抗草甘膦的转基因油菜,即MON 88302事件<sup>[36]</sup>。

1.1.4 通过基因融合获得的抗除草剂基因 人们将不同的除草剂耐性基因融合到一起,获得了耐多种除草剂的融合基因(表3)。先正达公司(Syngenta AG)构建双运载体15954,包括来源于产绿链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)的 *pat* 基因和来自燕麦(*Avena sativa*)的 *avhppd-03* 基因, *avhppd-03* 基因合成的p-HPPD对硝磺草酮有抗性,将该载体成功导入大豆中获得了抗草丁膦和硝磺草酮有抗性的转基因大豆<sup>[37]</sup>。先正达公司(Syngenta AG)构建双运载体 pDAB9582,将基因 *CryIF*、*CryIAC*、*add-12* 和 *pat* 重组在一起,即事件 pDAB9582.814.19.1: pDAB4468.04.16.1,成功导入到大豆中,获得了具有抗虫、抗除草剂能力的转基因大豆。*CryIF*、*CryIAC* 基因所表达的蛋白对鳞翅类昆虫具有抗性,可选择性地损伤它们的中肠黏膜。*aad-12* 基因来自食酸丛毛单胞菌(*Delftia acidovorans*),该基因表达的AAD-12可降解2,4-D和吡啶氧乙酸除草剂。*pat* 基因来自产绿链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*),此基因表达的PAT蛋白,具有抗草丁膦的特性<sup>[38]</sup>。美国陶氏益农公司(Dow AgroScience LLC)构建载体 pDAB8264,将基因 *aad-12*、*2mepsps*、*pat* 重组在一起,导入到大豆中,获得了转基因大豆 pDAB8264.42.32,使其对2,4-D、草甘膦和草丁膦有抗性<sup>[39]</sup>。先正达公司(Syngenta AG)构建双运载体18857,内含 *gs* 和 *pat* 基因,分别表达GS和PAT蛋白,这2种蛋白能使作物对草甘膦和草丁膦产生抗性,该载体已被成功导入多种作物中,如玉米、

油菜、水稻和小麦等<sup>[40]</sup>。

## 1.2 我国申请的抗除草剂基因专利

虽然从整体水平看,我国在转基因作物研究技术方面的进展与国际先进水平有一定差距,其中差距最大的,是在拥有自主知识产权的基因方面,这也影响到我国抗除草剂转基因作物的培育;但我国除了通过从自然界的新生物个体中获得耐除草剂基因以外,科学家还利用分子生物学手段对已有的抗性基因进行改造,例如基因突变、人工诱变、人工改造、密码子改造、融合基因等方式获取抗不同除草剂的基因,产生了不少原创性的研究成果。目前我国发表的抗除草剂基因主要有抗草甘膦、抗草丁膦、抗磺酰脲类、抗咪唑啉酮类4类(表4)。

1.2.1 自然来源的抗除草剂基因 国内抗草甘膦基因主要有2类,第一类是5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸(EPSP)合酶基因。中国农业科学院生物技术研究所从草甘膦污染的土壤中分离出的运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)筛选到一种新的EPSP合酶基因(ZM-EPSP合酶基因),并将该基因导入受体生物大肠杆菌和烟草中,使所得到的遗传工程重组生物获得抗草甘膦的能力<sup>[41]</sup>。还从采集的草甘膦极端污染环境的土壤样品中,采用免培养方法分离出群落水平总DNA构建群落水平总基因文库,并筛选草甘膦抗性转化子,对高耐受草甘膦的片段的全核苷酸序列测定,发现了GR79-EPSP合酶基因,该基因在植物中表达后,所获得的转基因植物对草甘膦具有更强的耐受性<sup>[42]</sup>。该所还从新疆塔克拉玛干沙漠边缘的红柳树根际土壤中分离出对草甘膦具有抗性的沙漠红细菌(*Rhodobacter shamoensis*)W402菌株<sup>[43]</sup>。此外,还从土壤细菌菌株K01中分离出抗草甘膦的K01*aroA*基因<sup>[44]</sup>。中国农业科学院生物技术研究所从苘麻(*Abutilon theophrasti*)中分离到的EPSPS基因序列,该序列所编码的EPSPS对草甘膦具有较好的抗性,以此基因构建载体pGEM-TE,借助根癌农杆菌LBA0044介导转化到烟草中而获得抗草甘膦的转基因烟草。该基因可作为功能基因用于抗草甘膦转基因植物的培育<sup>[45]</sup>。中国农业科学院作物科学研究所从草甘膦重度污染土

壤中筛选得到草甘膦抗性微生物假单胞菌(*Pseudomonas moraxellaceae*),通过实验验证了它具有高抗草甘膦的能力,将假单胞菌的抗性基因转入植物后,可使植物的抗草甘膦能力提高<sup>[46]</sup>。南京农业大学杂草研究室从麦冬(*Ophiopogon japonicus*)、土麦冬(*Liriope spicata*)和阔叶麦冬(*Liriope latyphylla*)中分离得到了新的抗草甘膦基因LSEPSP,并且对其进行改良得到一系列突变基因,这些基因可以用来产生转基因抗草甘膦植物,也可作为植物细胞培育中的筛选标记<sup>[47]</sup>。此类基因能够降低作物对草甘膦的亲合力,从而赋予对草甘膦更高的耐受性。上海市农业科学院从葡萄(*Vitis vinifera*)冠瘿病拮抗菌中筛选获得了一株能在草甘膦中生长的水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*),从该细菌中分离获得了抗草甘膦的*aroA-Ra*基因<sup>[48]</sup>。从极端嗜热菌海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)中分离出*aroA-Tm*基因,此基因表达的蛋白对草甘膦具有较高的耐受性<sup>[49]</sup>。东北农业大学从黄曲霉和假丝酵母菌(*Candida palmiophila*)中分离出EPSP合酶基因,此基因表达的EPSP合酶对草甘膦也具有抗性<sup>[50-51]</sup>。

刘柱等从被草甘膦极度污染的土壤中分离到一株极端抗草甘膦菌可变盐单胞菌(*Halomonas variabilis*),该细菌的*aroA*基因核苷酸序列与目前已报道的编码EPSP合酶的*aroA*基因几乎没有任何同源性,氨基酸序列与草甘膦抗性相关的美国专利所涉及的22种微生物EPSP合酶的同源性在46%以下;因此所克隆的是1个结构新颖、功能明确并高抗草甘膦的新基因,但未申请专利<sup>[52]</sup>。中国农科院生物技术研究所申请了抗草甘膦转基因陆地棉BG2-7的检测方法及侧翼序列,所转基因是拥有自主知识产权的*aroA*基因<sup>[53]</sup>;还申请了一种抗草甘膦转基因大豆及其制备方法和应用的专利,所转基因也是拥有自主知识产权的*aroA*基因以及草甘膦N-乙酰转移酶*gat*基因<sup>[54]</sup>。

南京农业大学农学院从大肠杆菌克隆到抗草甘膦的基因*argF*和*deoA*,基因可作为目的基因导入植物,以提高转基因植物抗草甘膦的能力。这2个基因对抗草甘膦可能与靶基因关系不大,其对靶基因的影响可能是间接的<sup>[55]</sup>。南通龙翔生物技

表3摇基因融合获得的抗除草剂基因

Table 3摇A review of the gene fusion obtained for herbicide - resistant genes

基因名称	编码蛋白	基因来源	抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	专利国家	专利申请保护国家	申请专利时间	转入的植物或用途
<i>pat</i> 和 <i>ahpppd-03</i>	<i>N-乙酰转移酶和对羟基苯丙酮酸双加氧酶</i>	产绿链霉菌和燕麦的 <i>ahpppd-03</i>	草丁膦、异恶唑草酮和硝磺草酮	消除草丁膦除草活性(磷丝菌素)的乙酰化作用	先正达公司	国际专利	国际专利	2011-12-09	大豆
<i>aad-12</i> , <i>2mEpsps</i> , <i>pat</i>	芳氧基链烷酸酯双加氧酶(AAD-12), EPSPS和N-乙酰转移酶(PAT)	食酸丛毛单胞菌、玉米、产绿链霉菌	草甘膦、草丁膦	载体构建	美国陶氏益农有限责任公司	国际专利	国际专利	2012-07-13	大豆
<i>CryIF</i> , <i>CryIAC</i> , <i>add-12</i> , <i>pat</i>	<i>cryIF</i> , <i>cryIAC</i> 产生 $\delta$ -内毒素 <i>aad-12</i> 合成芳氧基链烷酸酯双加氧酶(AAD-12) <i>pat</i> 表达草丁膦N-乙酰转移酶(PAT)	苏云金芽孢杆菌	草甘膦和草丁膦	载体构建 pDAB9582	美国陶氏益农有限责任公司	国际专利	国际专利	2012-07-26	大豆
<i>gs-pat</i>	谷氨酰胺合成酶和草丁膦乙酰转移酶	玉米 <i>EPSPS</i> 基因	草甘膦、草丁膦	耐性	先正达公司	国际专利	国际专利	2016-02-18	玉米、水稻、小麦

表4摇中国申请的在中国保护的抗除草剂基因

Table 4摇A review of the gene application for herbicide - resistant genes in China

基因名称	编码蛋白	基因来源	所抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	申请专利时间	转入的植物或用途
<i>G2-aroA</i>	Class I EPSP 合酶	可变盐单胞菌 ( <i>Halomonas variabilis</i> )	草甘膦	突变	中国农科院生物技术研究所	2015-05-04	棉花
<i>G2-aroA</i>	Class I EPSP 合酶、草甘膦N-乙酰转移酶	<i>G2-aroA</i> 来自于可变盐单胞菌	草甘膦	突变	中国农科院作物研究所	2015-12-30	大豆
<i>aroA</i>	Class I EPSP 合酶	假单胞菌	草甘膦	突变	中国农业大学	2010-05-14	单、双子叶植物
<i>AroA-Ra</i>	Class I EPSP 合酶	水生拉恩氏菌 ( <i>Rahnella aquatilis</i> )	草甘膦	突变	上海市农业科学院	2010-12-21	可用于植物
<i>aroA-Tm</i>	Class I EPSP 合酶	极端嗜热菌海栖热袍菌 ( <i>Thermoloba maritima</i> )	草甘膦	突变	上海市农业科学院	2014-05-22	可用于植物
<i>GR79-EPSPS</i>	Class I EPSP 合酶	土壤细菌群落水平总DNA	草甘膦	突变	中国农科院生物技术研究所	2007-11-09	可用于植物
<i>K01aroA</i>	Class I EPSP 合酶	土壤细菌菌株 K01	草甘膦	突变	中国农科院生物技术研究所	2016-02-08	大豆、玉米、水稻、油菜
<i>LSEFSPS1</i> , <i>LSEFSPS2</i> , <i>LSEFSPS3</i>	Class I EPSP 合酶	麦冬 ( <i>Ophiopogon japonicus</i> )、土麦冬 ( <i>Liriope spicata</i> )、阔叶麦冬 ( <i>Liriope latyphylla</i> )	草甘膦	突变	南京农业大学杂草研究室	2012-09-06	可用于作物、草坪、蔬菜、花卉等
<i>ZM-EPSPS</i>	Class II EPSP 合酶	运动发酵单胞菌 ( <i>Zymomonas mobilis</i> )	草甘膦	亲和性降低	中国农科院生物技术研究所	2005-10-17	烟草等植物
<i>EPSPS</i>	Class II 型 EPSP 合酶	假单胞菌	草甘膦	亲和性降低	中国农业科学院作物科学研究所	2013-08-26	玉米、水稻、小麦、大麦、高粱、棉花、大豆、烟草、马铃薯、白菜 ( <i>Brassica pekinensis</i> )、甘蓝、其他农作物

摇Table 4 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	所抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	申请专利时间	转入的植物或用途
<i>EPSPS</i>	Class II EPSP 合酶	土壤宏基因组	草甘膦	亲和力降低	吉林省农业科学院	2012-11-02	可用于植物
<i>G7 (Dein RI EPSPS)</i>	EPSP 合酶,既不属于 Class I 也不属于 Class II	放射线球菌 R1 ( <i>Deinococcus radiodurans</i> R1)	草甘膦	亲和力降低	沈志成	2009-04-30	水稻、玉米、棉花、大麦、大豆、草坪草
<i>epsps</i>	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS)	苘麻 ( <i>Abutilon theophrasti</i> )	草甘膦	该序列所编码的 EPSPS 对草甘膦具有较好的抗性	中国农业科学院生物技术研究所	2010-08-18	烟草等植物
<i>epsps</i>	EPSP 合酶	克雷伯氏细菌 ( <i>Klebsiella trevisan</i> )	草甘膦	不详	广西壮族自治区农业科学院微生物研究所	2012-02-10	可用于植物
<i>epsps</i>	EPSP 合酶	黄曲霉 ( <i>Aspergillus flavus</i> )	草甘膦	不详	东北农业大学	2016-01-28	可用于植物
<i>epsps</i>	EPSP 合酶	假丝酵母菌 ( <i>Candida palmiobophila</i> )	草甘膦	不详	东北农业大学	2016-01-28	可用于植物
<i>epsps</i>	EPSP 合酶	土壤微生物 (未鉴定)	草甘膦	不详	南通龙翔生物技术有限公司	2014-11-06	可用于植物
不详	不详	沙漠红细菌 W402 ( <i>Rhodobacter shamoensis</i> W402)	草甘膦	不详	中国农业科学院生物技术研究所	2014-03-07	
<i>argF</i> 和 <i>deoA</i>	基因帮助生物耐受草甘膦可能是间接的影响靶基因实现的	肠杆菌 (未说明) (Enterobacteriaceae)	草甘膦	不详	南京农业大学	2015-10-22	可用于植物
<i>gld</i>	草甘膦裂解酶 (C-P 裂解酶)	苜蓿根瘤菌 M010 ( <i>Rhizobium meliloti</i> )	草甘膦	裂解	中山大学	2001-06-19	可用于植物
<i>gat</i>	草甘膦-N-乙酰转移酶	土壤细菌	草甘膦	脱毒	中国农业科学院	2005-10-17	烟草
细胞色素 P450	细胞色素 P450	结缕草 ( <i>Zoysia japonica</i> )	多种除草剂	解毒	杭州瑞丰生物科技有限公司	2011-08-18	可用于水稻、玉米、棉花、大豆、烟草、油菜、大麦、小麦或高粱的抗除草剂品种的培养
编码 ALS 的基因	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	水稻品种 黄华占和黄丝占	咪唑啉酮类	ALS 突变蛋白对咪唑啉酮类除草剂有良好的抗性	深圳兴旺生物种业有限公司	2012-02-20	可用于植物
<i>BnALS1R</i>	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	人工诱变油菜	咪唑啉酮类	突变	江苏省农业科学院	2010-07-21	油菜
<i>BnALS3R</i>	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	人工诱变油菜	磺酰脲类	突变	江苏省农业科学院	2013-04-02	油菜
<i>OsmALS</i>	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	人工诱变水稻	咪唑啉酮类和磺酰脲类	突变	深圳市作物分子设计育种研究院	2014-12-24	水稻
4 个位点突变的 ALS 突变基因	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	人工诱变水稻	咪唑啉酮类和磺酰脲类	突变	江苏省农业科学院	2016-04-22	水稻
2 个位点突变的 ALS 突变基因	乙酰乳酸合成酶 (ALS)	水稻品种 荆型常规水稻 9311	百草通 (咪唑啉酮类和磺酰脲除草剂)	ALS 突变蛋白对咪唑啉酮类除草剂有良好的抗性	江苏省农业科学院	2016-04-12	棉花、拟南芥

术有限公司从土壤细菌中克隆到1个抗草甘膦的EPSP合酶基因,但未进行深入研究。

第二类是草甘膦降解酶基因。中山大学从苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti* M010)中分离出草甘膦降解酶基因(*GLD*),此基因可以表达C—P裂解酶,使草甘膦的C—P键断裂,从而赋予对草甘膦的耐受性<sup>[56]</sup>。

1.2.2 人工诱变获得的抗除草剂基因 除了抗草甘膦基因外,还采用人工诱变的方法获得了咪唑啉酮类和磺酰脲类除草剂的基因5个,并获得了抗性油菜和水稻。江苏省农业科学院筛选到了自然突变的咪唑啉酮类除草剂的甘蓝型油菜,把突变基因的核酸序列命名为*BnALS1R*基因,应用杂交、回交等植物常规育种方法将该基因导入其他对咪唑啉酮类除草剂无抗性的油菜品种或品系,提高了目标品种或品系对咪唑啉酮类除草剂的耐受性<sup>[57]</sup>。还以甘蓝型油菜抗磺酰脲类除草剂突变体为材料,获得突变体中的抗性基因,命名为*BnALS3R*基因,利用构建的植物表达载体将该基因导入对磺酰脲类除草剂无抗性的植物中,可提高转基因植物对磺酰脲类除草剂的抗性<sup>[58]</sup>。深圳兴旺生物种业有限公司利用甲磺酸乙酯(EMS)诱变水稻品种黄华占和黄丝占,筛选获得咪唑啉酮类除草剂的黄丝占和黄华占突变植株。在存在咪唑啉酮类除草剂的情况下,这些突变体的乙酰乳酸合成酶(ALS)基本都保持了原有酶活性,表明突变ALS酶具有咪唑啉酮类除草剂的特性。核酸和蛋白序列分析结果显示,*als*基因发生点突变,其编码的ALS蛋白带有Trp548、Ala96或Ser627突变<sup>[59]</sup>。江苏省农业科学院对籼稻优良恢复系9311的EMS突变植株进行长期、不断的筛选,发现了1个Gln25、Gln113和Ala237位点发生突变的蛋白,还发现了1个在Gln25、Gln113、His367和Ser627位点的突变,使水稻具有ALS抑制剂类除草剂的抗(耐)性,特别是对咪唑啉酮类和磺酰脲类除草剂的抗(耐)性<sup>[60]</sup>。

1.2.3 基因突变获得的抗除草剂基因 人们通过对原有的抗除草剂基因进行人工改造、融合获得的抗除草剂基因(表5)如下:中山大学采用基因优化的方法获得了多点突变的、具有较强草甘

膦抗性的EPSP合成酶基因,提高了EPSP合酶的催化效率,降低了酶与草甘膦的亲合力,使该酶抵御草甘膦的能力大幅度提高。其中*aroAM12*是其所编码的具有草甘膦抗性的EPSP合成酶与鼠伤寒沙门氏杆菌*aroA*所编码的氨基酸序列发生了7个位置的置换;*aroAM13*是其所编码的具有草甘膦抗性的EPSP合成酶与大肠杆菌*aroA*所编码的氨基酸序列发生了2个位置的置换<sup>[61]</sup>。2个突变基因都有望成为构建抗草甘膦农作物新品种的优良材料。

中国科学院遗传与发育生物学研究所构建含有水稻EPSP合酶基因的大肠杆菌组成型表达载体,并利用易错PCR技术对大肠杆菌表达载体中的EPSP合酶进行随机突变,再将含有EPSP合酶突变基因的大肠杆菌表达载体导入宿主菌,获得EPSP合酶基因突变库,筛选后获得抗草甘膦的重组子,测序得到水稻EPSP合酶基因突变体,该突变体的EPSP合酶基因对草甘膦具有高度抗性<sup>[62]</sup>。

杭州瑞丰生物科技有限公司从放线杆菌(*Deinococcus radiodurans*) R1中分离出了Dein R1 EPSP合酶(该EPSP合酶既不属于Class I,也不属于Class II,其抗性机理尚不明确)基因,编码基因命名为G7,该基因对草甘膦具有较高的抗性<sup>[63]</sup>。接着人工改造抗性基因*G1174*,获得了高抗草甘膦的EPSP合酶基因*G10*<sup>[64]</sup>。该基因可用于转基因水稻、玉米、棉花、大麦、大豆、草坪或牧草的开发。

上海市农业科学院采用分子重排技术获得了草甘膦抗性增强的来源于苹果和葡萄的EPSP合酶多位点突变体及其编码基因。这些突变体具有较高的草甘膦抗性和较强的与磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)亲和性,这为该基因用于抗草甘膦转基因作物的培育提供了可能<sup>[65-66]</sup>。

1.2.4 密码子改造获得的抗除草剂基因 刘坚根据变异的抗草甘膦基因*2mG2-epsps*编码的氨基酸组成,利用玉米密码子偏好性进行设计、改造后用人工合成的方法获得了抗草甘膦基因*MTP-SMG2-EPSPS*。改造后人工合成的EPSP合酶基因经鉴定在玉米中能高效表达,获得的抗草甘膦玉米与非转基因对照相比具有明显的抗草甘膦的

表5 摇人工改造的抗除草剂基因

Table 5摇A review of the artificial transformation for herbicide – resistant genes in China

基因名称	编码蛋白	基因来源	所抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	申请专利时间	已转入的植物或用途
<i>aroA</i> M12, <i>aroA</i> M13	EPSP 合酶	大肠杆菌 <i>aroA</i>	草甘膦	点突变	中山大学	2001 – 05 – 24	可用于改良农作物
水稻 EPSPS 合酶 基因	EPSP 合酶	水稻 EPSP 合酶基因	草甘膦	突变	中国科学院遗传与发育生物学研究所	2005 – 01 – 26	可用于蔬菜等作物
<i>G10</i>	EPSP 合酶	放线杆菌 ( <i>Deinococcus radiodurans</i> ) R1 中分离的 G1174	草甘膦	突变	杭州瑞丰生物科技有限公司	2011 – 01 – 17	水稻、玉米、棉花、大麦、大豆、草坪草
突变的高粱 EPSP 合酶基因	EPSP 合酶	高粱 EPSPS 合酶基因	草甘膦	突变	中国农业大学	2012 – 10 – 23	玉米
<i>CC – M EPSPS</i>	EPSP 合酶	根癌农杆菌 CP4	草甘膦	密码子优化	中国农业大学	2012 – 10 – 23	玉米
苹果 EPSP 合酶 8 位点突变基因	EPSP 合酶	苹果 ( <i>Malus pumila</i> )	草甘膦	DNA 分子重排	上海市农业科学院	2013 – 03 – 26	水稻
<i>mc2 – epsps</i>	EPSP 合酶	棉花翼棉 14 中克隆抗草甘膦 EPSP 合酶基因	草甘膦	融合基因构建双价表达载体	创世纪种业有限公司	2013 – 08 – 26 2015 – 06 – 15	棉花
<i>MTP – SMC2 – EPSPS</i>	EPSP 合酶	2 <i>mG2 – epsps</i>	草甘膦	密码子优化	刘坚	2013 – 08 – 01	玉米
<i>LSEPSPS</i>	EPSP 合酶	麦冬、土麦冬、阔叶麦冬	草甘膦	人工突变	南京农业大学杂草研究室	2013 – 09 – 04	可用于作物、草坪、蔬菜、花卉等
<i>wCTP ·GR 79m</i>	EPSP 合酶	GR79 的 EPSP 合酶基因从极端污染环境草甘膦抗性菌株中分离	草甘膦	密码子优化	中国农业科学院作物科学研究所	2014 – 06 – 06	小麦
葡萄的 EPSP 合酶 7 位点突变基因	EPSP 合酶	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )	草甘膦	DNA 分子重排	上海市农业科学院	2014 – 07 – 31	水稻
<i>maroAGC</i>	EPSP 合酶	根癌农杆菌 CP4	草甘膦	融合基因 (连接叶绿体信号肽)	中国农业大学	2015 – 11 – 30	玉米
人工改造 <i>GR79</i> 和 <i>GAT</i> 基因	EPSP 合酶	<i>GR79</i> 和 <i>GAT</i> 基因来源于土壤细菌群落水平总 DNA	草甘膦	密码子优化、载体构建	中国农业科学院生物技术研究所	2014 – 05 – 15	双价抗草甘膦转基因棉花
人工改造的 <i>CP4 – EPSPS</i> 和 <i>PAT</i> 基因	EPSP 合酶和膦丝菌素转移酶	<i>CP4 – EPSPS</i>	草甘膦、草丁膦	密码子优化、融合基因	北京大北农科技集团股份有限公司	2015 – 04 – 30	玉米
人工改造的抗草甘膦相关蛋白 M1s40 基因	不详	米曲霉 ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	草甘膦	融合基因	东北农业大学	2016 – 01 – 29	可用于细菌、植物、真菌或藻类
草甘膦和草丁膦复含抗性的融合蛋白基因	EPSP 合酶和谷氨酰胺合成酶	抗草甘膦编码基因因为 <i>CP4</i> 、 <i>aroA</i> 、 <i>G7</i> 、 <i>G10</i> 、 <i>GOX</i> 或 <i>GAT</i> 抗草丁膦编码基因 为 <i>bar</i> 或 <i>pat</i>	草甘膦、草丁膦	融合基因	浙江大学	2016 – 08 – 28	玉米、水稻、大豆、小麦、油菜
人工合成的含水稻 <i>epsps</i> 的突变基因 <i>epspsM</i> 的表达载体	EPSP 合酶	水稻 <i>epsps</i> 的突变基因	草甘膦	人工合成	福建省农业科学院生物技术研究所	2016 – 06 – 21	水稻



续 Table 5 (to be continued)

基因名称	编码蛋白	基因来源	所抗除草剂名称	作用机制	专利拥有者	申请专利时间	已转入的植物或用途
G23V-EPSPS	EPSP 合酶	Genbank :CM718572.1 的 EPSPS 基因	草甘膦	融合基因	北京市农林科学院	2016-04-19	玉米
抗草甘膦融合蛋白编码基因	EPSP 合酶	EPSPS 蛋白编码基因为下列之一 - CP4、aroA、G7 或 G10 草甘膦 N-乙酰转移酶编码基因为 CP4-GAT 草甘膦氧化酶编码基因为 CP4-GOX	草甘膦	融合基因	浙江大学	2016-08-28	玉米 水稻 大豆 小麦 油菜
OxGS1 2	谷氨酰胺合成酶	水稻	草丁膦	过量表达	华中农业大学	2008-10-17	水稻

能力<sup>[67]</sup>。中国农业科学院作物科学研究所利用小麦密码子偏好性对从极端土壤中抗性细菌中分离的 GR 79-EPSPS 进行人工设计,并在 N 段添加来自小麦 RubisCO 小亚基的叶绿体导肽,通过人工合成法获得了改造的基因 *wCTP:GR 79m*,并将其应用于小麦转化时作为筛选标记基因,获得了抗草甘膦的转基因小麦,该转基因小麦的抗性高于优化前小麦的转基因抗性<sup>[68]</sup>。

中国农业科学院生物技术研究所对来源于土壤微生物总 DNA 的草甘膦抗性基因 *GR79* 和 *gat*,按照棉花宿主偏爱密码子表对 2 个基因进行核苷酸水平上的编辑,通过生物信息学工具进一步对编辑后的序列进行加工,目的是调整基因总体 GC 水平,优化限制性酶切位点,去除可能抑制性负调控元件及优化 mRNA 结构提高 mRNA 稳定性等。将优化后的 2 个抗草甘膦基因构建到双价表达载体上进行同时表达,所得转基因棉花施用草甘膦后与未进行草甘膦处理对照植株生长状况差异不明显,以上结果证明获得的双价抗草甘膦转基因棉花具有较强的草甘膦抗性。本发明对于培育具有自主知识产权的高抗草甘膦棉花具有非常重要的意义<sup>[69]</sup>。

北京大北农科技集团股份有限公司培育了同时抗草甘膦和草丁膦的转基因玉米事件 DBN9877,抗草甘膦基因是 5-烯醇丙酮酰莽草酸 3-磷酸合酶基因(EPSPS)是从土壤农杆菌菌株中分离得到的,且可以通过优化密码子或者以其他方式改变编码的多核苷酸;抗草丁膦基因(*pat*)是编码膦丝菌素 N-乙酰基转移酶(PAT)的基因<sup>[70]</sup>。

1.2.5 通过基因融合获得的抗除草剂基因 中国农业大学根据 CP4-EPSPS 不同区域的活性分析及玉米基因组特点,对 CP4-EPSPS 的密码子及编码框进行了改造,改造后的核苷酸序列与原始的 EPSPS 同源性仅为 88%。同时在优化后的 EPSPS 基因 5' 端增加了 1 个来源于高粱的叶绿体转运肽,将该重组基因命名为 *CC-M EPSPS*。通过对转 CP4-EPSPS 基因及 *CC-M EPSPS* 基因的玉米不同转化事件的分析,发现转 *CC-M EPSPS* 基因更容易获得高表达的转化事件<sup>[71]</sup>。把该

基因转入玉米中,获得了有自主知识产权的转基因抗草甘膦玉米 CC-2。又克隆了高粱基因的叶绿体信号肽,将其与优化的 *epsps* 基因连接,命名为 *maroACC*,通过基因枪共转化的方法把该基因转入到具有高转化效率的玉米自交系及杂交组合中,用草甘膦进行筛选,获得了1个玉米优良转化体<sup>[72]</sup>。

创世纪种业有限公司从陆地棉冀棉14中克隆抗草甘膦 *EPSPS* 基因,并进行人工改造,获得了融合的抗草甘膦 *mc2-epsps* 基因<sup>[73]</sup>;接着构建了含2个拷贝该基因的抗性表达环形载体,导入该植物表达载体的转基因棉花具有非常强的草甘膦抗性<sup>[74]</sup>。

北京市农林科学院将编码玉米叶绿体信号肽的 *rbcS* 基因与 GenBank: GM718572.1 的 *epsps* 基因融合,获得了融合序列的优化基因 *G23V-EPSPS*,将该基因转入玉米中获得了具有高抗草甘膦特性的玉米品种<sup>[75]</sup>。

浙江大学人工合成了一种抗草甘膦融合蛋白编码基因,该基因由 *EPSPS* 蛋白编码基因和草甘膦 *N*-乙酰转移酶或草甘膦氧化酶编码基因构成,*EPSPS* 蛋白编码基因为下列之一: *CP4*、*aroA*、*G7* 或 *G10*,所述草甘膦 *N*-乙酰转移酶编码基因为 *gat*,所述草甘膦氧化酶编码基因为 *gox*。该抗草甘膦蛋白可以通过不同的耐受机制赋予转基因植物对草甘膦的高抗特性。该抗草甘膦融合蛋白可以应用于单子叶植物和双子叶植物的抗草甘膦方面,主要应用于玉米、水稻、大豆、小麦和油菜<sup>[76]</sup>。还人工合成了草甘膦和草丁膦复合抗性的融合蛋白基因,抗草甘膦编码基因为 *CP4*、*aroA*、*G7*、*G10*、*GOX* 或 *gat*,抗草丁膦编码基因为 *bar* 或 *pat*,对2种除草剂都有抗性,可用于制备具有草甘膦与草丁膦复合抗性的转基因植物<sup>[77]</sup>。

福建省农业科学院构建了可在水稻的生长发育期全程表达草甘膦抗性的载体,并且在幼穗分化期花器官组织特异性地增强表达。该载体由双表达盒组成,其中1个表达盒由水稻幼穗分化期特异表达基因启动子、水稻叶绿体转运肽、抗草甘膦基因(抗草甘膦基因来源于水稻 *epsps* 的突变基因 *epspsM*) 和终止子组成;另一个表达盒由组成型

启动子、叶绿体转运肽、抗草甘膦基因以及终止子组成。利用该载体获得的转基因水稻,其在生长发育的所有组织器官对草甘膦有较高抗性外,还在水稻幼穗分化期提高花器官组织对草甘膦的抗性,解除草甘膦对水稻花器官的损害,保证水稻的产量<sup>[78]</sup>。

## 2 国内外抗除草剂基因专利的差距

通过对比国内外抗除草剂转基因作物方面的专利,发现中国与国际间还是存在很大的差距的。

### 2.1 抗除草剂基因国际专利分析

在52项国际专利中,属于自然来源的专利有42项,属于人工改造的有6项,属于融合基因的有4项。

根据抗除草剂基因的性能,可将这52项国际专利分为抗1种除草剂(简称单抗)和抗2种以上除草剂(简称多抗)2类,且单抗占82.7%,多抗占17.3%。这52项专利中的基因主要对草甘膦、草丁膦、磺酰脲类、溴苯腈、2,4-D、麦草畏、咪唑啉酮类、苯并咪唑类、吡啶甲酸酯类、原卟啉原氧化酶(PPO)抑制剂类、羟苯基丙酮酸加双氧酶(HP-PD)抑制剂类、芳氧苯氧基丙酸酯类(包括喹禾灵)和环己烯酮类共13个种类的除草剂有抗性。

在单抗的除草剂基因专利中,共有31种抗除草剂基因,且都属于自然来源的抗除草剂基因,其中有18种来自细菌,13种来自植物,只有1种是人工改造获得的抗性基因。

在9项多抗的除草剂基因专利中,共有9种抗除草剂基因,这9种基因中有5种来自细菌,3种来自植物,1种通过人工改造获得。从蓝色链霉菌(A3)中获得的 *DSM-2* 基因对草甘膦、草丁膦、2,4-D这3种除草剂有抗性,而且具有抗虫的特性;从鞘氨醇单胞菌中克隆的 *aad-1* 基因具有降解2,4-D和芳氧苯氧基丙酸酯(如喹禾灵)类除草剂的特性;分别从食酸丛毛单胞菌和鞘氨醇单胞菌中克隆的 *aad-12* 和 *aad-13* 基因具有抗2,4-D和吡啶氧乙酸除草剂的特性;从植物中筛选克隆得到的 *PtJBMT3* 基因对2,4-D和生长素类除草剂有抗性;编码ALS的基因对磺酰脲、咪唑啉酮类除草剂有抗性;从小麦中克隆得到的编码

ACCase 的基因对芳氧苯氧丙酸酯类、环己烯酮类除草剂有抗性;从燕麦中获得的 *avhppd-03* 基因对草丁膦、异噁唑草酮和硝磺草酮这 3 种除草剂有抗性。以及通过改造拟南芥中的 *als* 突变基因获得的 *A122*、*P197* 和 *W574* 对磺酰脲类和咪唑啉酮类除草剂有抗性。

## 2.2 抗除草剂基因国内专利分析

在我国,共有 48 项抗除草剂基因的专利,属于自然来源的专利有 28 项,属于人工改造的专利有 20 项。根据抗除草剂基因的性能,可将这 48 项专利分为单抗和多抗 2 类,且单抗占 91.7%,多抗占 8.3%。这 48 项专利中的基因主要对草甘膦、草丁膦、咪唑啉酮类、磺酰脲类 4 种除草剂有抗性。

在单抗的除草剂基因专利中,共有 19 种抗除草剂基因,这 19 种基因有 14 种来自细菌,5 种来自植物。且这 19 种基因中有 14 种是属于自然来源的抗除草剂基因,5 种是人工改造获得的抗性基因。

在多抗的除草剂基因专利中,共有 2 种抗除草剂基因,这 2 种基因均来自植物,且均属于自然来源的抗除草剂基因,分别是抗多种除草剂的细胞色素 P450,以及抗咪唑啉酮类和磺酰脲类除草剂的突变型基因 *als*。

## 3 我国抗除草剂基因的研发策略

### 3.1 重点开发植物来源的抗性基因

从我国抗草甘膦基因来看,19 项专利是从微生物中克隆的抗草甘膦基因,2 项专利是从植物中克隆的抗性基因。相对于细菌等来源的抗草甘膦基因,植物来源的进化抗性天然抗性基因在培育抗草甘膦作物后的生态环境和食品安全风险要低于其他生物类别的异源基因,提高民众心理的认可。因此今后应该主要发展植物源的抗草甘膦基因以及其他除草剂的抗性基因。

### 3.2 加大灭生性除草剂草丁膦抗性基因的研发

在我国有自主知识产权的抗除草剂基因中,尚无灭生性除草剂草丁膦的抗性基因。草丁膦和草甘膦相比,同样属于优秀的灭生性除草剂,毒性低,在土壤中易于降解,对作物安全,不易飘移,活

性高,用量少,环境压力小,杀草迅速,能快速杀死多种禾本科和阔叶杂草,因此应加大抗草丁膦基因的发掘。

### 3.3 加强除草剂解毒基因的发掘

细胞色素 P450s 能通过羟基化或脱烷基来代谢乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase)、乙酰乳酸合成酶 (ALS) 和光系统 II (PS II) 抑制剂类除草剂,达到解细胞毒性的目的。谷胱甘肽转移酶 (GSTs) 也被证明参与了除草剂的解毒代谢过程。目前,对细胞色素 P450s 和 GSTs 解除草剂毒性的分子机制仍然知之甚少。不过,越来越多的研究表明在自然界中任何抗性机制都是可能发生的。事实上,非靶点抗性机制更为普遍,且容易产生更高的抗性水平;因此应该加强除草剂解毒基因的发掘。目前只有 1 个专利是关于细胞色素 P450 的解毒基因。

### 3.4 加大人工诱变获得的抗性基因的研究和抗性作物培育

抗除草剂转基因作物的选育首先是作为一种杂草防除对策而提出的;但抗性基因的流向和由此引发的食品安全性问题始终存在着巨大的争议,甚至在一定程度上阻碍了转基因技术的发展。而常规育种手段虽不能像转基因技术一样将物种之间的基因资源利用得十分充分,但却以其自身没有外源基因转入而更容易被接受和推广。目前,通过非转基因手段培育的抗除草剂作物涉及玉米、大豆、菜豆、烟草等。所抗除草剂包括咪唑啉酮类、磺酰脲类、环己烯酮类、有机磷类、均三氮苯类和激素类等等,其中最为突出的是抗咪唑啉酮类除草剂的系列作物。因此利用 CRISPR9 等现代生物技术进行原位修饰改造作物基因,培育非转基因抗除草剂作物新品种更具有发展前景。

### 3.5 合理开发抗性基因的叠加性状

随着转基因技术的发展,在培育新品种方面将发挥主要作用,为了改良品种的多种性状将多目标基因转移到一个品种中将越来越普遍。美国已经有能抗 2 种除草剂(抗草甘膦和草丁膦)并抗虫的玉米品种的商业化种植。

随着转基因技术的发展,多抗及复合性状的

转基因作物的研发日益受到人们的重视,通过ISAAA的数据可以看出,目前国外已经开发出大量的多抗及复合性状的转基因作物。单一抗除草剂的作物在长期使用所抗除草剂后,田间杂草产生抗药性的概率将大大增加,那么该抗除草剂作物也将失去应用的效果。与抗单一除草剂的转基因作物相比,具有双抗甚至多抗除草剂以及复合性状的转基因作物以轮换除草剂的使用,避免抗性杂草的产生。因此建议培育抗2种以上除草剂的作物,加强多抗基因的挖掘,另外还建议培育抗除草剂和抗虫的具有复合性状的作物,提高转基因作物的经济价值和生态效益。

#### 参考文献:

- [1] James C. Global status of Commercialized biotech/GM crops: 2004—2016 [R]. ISAAA in Brief—ISAAA.org 2014—2016.
- [2] Qiang S, Song X L, Dai W M. Opportunities and challenges for herbicide-resistant crops and their development strategies [J]. Journal of Agricultural Biotechnology 2010, 18 (1): 114—125.
- [3] Duke S O. Perspectives on transgenic herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction [J]. Pest Management Science 2015, 71 (5): 652—657.
- [4] Vila-Aiub M M, Balbi M C, Gundel P E, et al. Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean [J]. Weed Science 2007, 55 (6): 566—571.
- [5] Comai L. 5-Enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase resistant to inhibition, production et utilisation: EP 0115673 A2 [P]. 1984-08-15.
- [6] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases: US05633435 [P]. 1997-05-27.
- [7] Denny R B. Method and system for creating astronomical observing plants for automated observatories: US20060224324 A1 [P]. 2006-10-05.
- [8] Dick, Elaine Q, John R, et al. Glyphosate degrading bacteria: WO/1992/019719 [P]. 1992-11-12.
- [9] Barry G F. Phosphonate metabolizing plants: WO/1999/027152 [P]. 2000-05-25.
- [10] Castle L A, Dan S, Giver L, et al. Novel glyphosate-N-acetyltransferase (GAT) genes: WO/2003/092360 [P]. 2003-11-13.
- [11] Balthazor, Terry M. Process for the preparation of a glyphosate product: US04654429 [P]. 1987-03-31.
- [12] Takase, Masayuki, Yoshida, et al. Herbicidal composition: EP86117038.9 [P]. 1987-08-19.
- [13] Lira J M, Wright T R, Hey T D, et al. Constructs for expressing herbicide tolerance genes, related plants, and related trait combinations: WO/2009/152359 [P]. 2009-12-17.
- [14] Gocal G F W, Beetham P R, de Schopke A, et al. Mutated protoporphyrinogen oxidase (PPX) genes: US20120122223 A1 [P]. 2012-05-17.
- [15] Gocal G F W, Beetham P R, De Schopke A, et al. Mutated protoporphyrinogen oxidase (PPX) genes: EP2600710 [P]. 2013-06-12.
- [16] Chen F, Zhao A, Gregory. Novel herbicide resistance gene: US20130109075 A1 [P]. 2013-05-02.
- [17] Lira J M, Snodderley E, Robinson A E, et al. Uses and detection of herbicide resistance genes for resistance to aryloxyalkanoate herbicides: US09062284 B2 [P]. 2015-06-23.
- [18] Wright T, Lira J M, Walsh T A, et al. Novel herbicide resistance genes: EP2484767 A1 [P]. 2012-08-08.
- [19] Albert H, Bermudez E R, Castle L A, et al. Compositions and methods comprising sequences having hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) activity: US09187761 B2 [P]. 2015-11-17.
- [20] Albert H, Bermudez E R, Castle L A, et al. Compositions and methods comprising sequences having hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) activity: US09187761 B2 [P]. 2015-11-17.
- [21] Clemente T E, Dumitru R, Feng P C C, et al. Modified DMO enzyme and methods of its use: US07884261 B2 [P]. 2011-02-08.
- [22] Walsh T A, Hicks G, Honma M, et al. Resistance to auxinic herbicides: US8071847 [P]. 2011.
- [23] Shen Z C, Lin Z Y. Herbicide resistant gene and use thereof: WO/2012/068966 [P]. 2012-05-31.
- [24] Haley S, Ostlie M, Valdez V A, et al. Acetyl co-enzyme a carboxylase herbicide resistant plants: WO/2012/106321 [P]. 2012-08-09.
- [25] Hinga M, Griffin S, Moon M S, et al. Methods and compositions to produce rice resistant to accase inhibitors: WO/2013/016210 [P]. 2013-01-31.
- [26] Hain R, Johann G, Donn G. Use of ALS inhibitor herbicides for control of unwanted vegetation in ALS inhibitor herbicide tolerant beta vulgaris plants: WO/2012/049266 [P]. 2012-04-19.
- [27] Alibhai M F, Cajacob C, Feng P C C, et al. Glyphosate resistant class I 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EP-SPS): US20100197498 A1 [P]. 2010-08-05.
- [28] Hoffman T, Parkhurst D M, Zhou N, et al. Stacked herbicide tolerance event 8264. 42. 32. 1, related transgenic soybean lines, and detection thereof: WO/2013/010094 [P]. 2013-01-17.
- [29] Kaijalainen S, Koivu K, Kuvshinov V, et al. Herbicide resistant camelina sativa: WO/2010/147636 [P]. 2010-12-23.

- [30] Kinney A J, Stecca K L, Meyer K. Soybean event DP-305423-1 and compositions and methods for the identification and/or detection thereof: US08609935B2 [P]. 2013-12-17.
- [31] Sathasivan K, Murai N. Mutant acetolactate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* for conferring imidazolinone resistance to crop plants: US06225105 [P]. 2001-05-01.
- [32] Gioia P. Herbicidal composition comprising an aminophosphate or aminophosphonate salt and a betaine: US20080103047A1 [P]. 2008-05-01.
- [33] Gocal G F W, Knuth M E, Beetham P R. EPSPS mutants: US08268622B2 [P]. 2012-09-18.
- [34] Cui H, Liang Y, et al. Tonoplast sodium-hydrogen anti-protein nhx2 of *Thellungiella halophila* and coding gene and use thereof: WO/2014/172825 [P]. 2014-10-30.
- [35] Han G, Jiang F, Deng D, et al. Synthetic glyphosate-resistant gene and use thereof: WO/2013/152624A1 [P]. 2013-10-17.
- [36] Brown A J, Byrne J F, Cole R H, et al. Transgenic *Brassica* event MON 88302 and methods of use thereof: US8816156 [P]. 2014.
- [37] Hipskind J, Burgin K, Jain R, et al. Soybean event syht0h2 and compositions and methods for detection thereof: US20140201860A1 [P]. 2014.
- [38] Cui Y C, Hoffman T, Parkhurst D M, et al. Insect resistant and herbicide tolerant breeding stack of soybean event PDAB9582. 814. 19. 1 and PDAB4468. 04. 16. 1: EP2736322A1 [P]. 2014-06-04.
- [39] Cui Y, Hoffman T, Zhou N, et al. Stacked herbicide tolerance event 8264. 44. 06. 1, related transgenic soybean lines, and detection thereof: US09540655B2 [P]. 2017-01-10.
- [40] Unkefer P J, Knight T J, Anderson P S. Transgenic plants with enhanced growth characteristics: EP2334166A2 [P]. 2011-06-22.
- [41] Chen M, Lin M, Dun B Q, et al. EPSP synthase gene for *Zymomonas mobilis* glyphosate and application thereof: CN 2005.
- [42] 林敏, 刘柱. 可变盐单胞菌高抗草甘膦的 EPSP 合酶及其编码序列: CN1664095 [P]. 2005-09-07.
- [43] 张维, 王琳, 吴港, 等. 耐辐射沙漠红细菌及其应用: CN103911318A [P]. 2014-07-09.
- [44] 陆伟, 燕永亮, 战翥华, 等. 一种高耐受草甘膦的 EPSP 合酶及其应用: CN105543188A [P]. 2016-05-04.
- [45] 程海刚. 抗草甘膦基因(EPSPS)的克隆与功能验证[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- [46] 王国英, 曹高焱, 刘允军. 一种高抗草甘膦 EPSP 合酶及其编码基因和应用: CN103484438A [P]. 2014-01-01.
- [47] 强胜, 毛婵娟, 陈世国, 等. 一种具有草甘膦耐性的基因及其应用: CN103436547A [P]. 2013-12-11.
- [48] 彭日荷, 姚泉洪, 熊爱生, 等. 水生拉恩氏菌的 EPSP 合酶基因 AroA-Ra 多位点突变体: CN102559708A [P]. 2012-07-11.
- [49] 王丽娟, 姚泉洪, 彭日荷. 源于海栖热袍菌的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶基因及其应用: CN105087611A [P]. 2015-11-25.
- [50] 陶波, 金龙国, 于海涛, 等. 一种源自黄曲霉的抗草甘膦相关蛋白及其编码基因与应用: CN105586324A [P]. 2016-05-18.
- [51] 陶波, 邱丽娟, 邵百惠, 等. 一种源自假丝酵母的抗草甘膦相关蛋白及其编码基因与应用: CN105505895A [P]. 2016-04-20.
- [52] 刘柱. 可变盐单胞菌中草甘膦抗性 EPSP 合酶新基因克隆、大肠杆菌表达及其抗性机制的研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [53] 王志兴, 王旭静, 唐巧玲, 等. 耐草甘膦转基因陆地棉 BG2-7 的检测方法及侧翼序列: CN106191218A [P]. 2016-12-07.
- [54] 邱丽娟, 郭兵福, 郭勇, 等. 一种抗草甘膦转基因大豆及其制备方法与应用: CN105505981A [P]. 2016-04-20.
- [55] 赵团结, 费云燕, 盖钧镒. 肠杆菌耐草甘膦基因 argF、编码蛋白及其应用: CN105177029A [P]. 2015-12-23.
- [56] 徐培林, 步怀宇, 何鸣, 等. 草甘膦降解酶基因和含该基因的载体: CN1392261 [P]. 2003-01-22.
- [57] 胡茂龙, 浦惠明, 戚存扣, 等. 抗咪唑啉酮类除草剂的甘蓝型油菜突变基因及其应用: CN101935667A [P]. 2011-01-05.
- [58] 胡茂龙, 浦惠明, 龙卫华, 等. 一种甘蓝型油菜抗磺酰脲类除草剂基因及其应用: CN103266118A [P]. 2013-08-28.
- [59] 陈竹锋, 王承旭, 柳威, 等. 水稻抗除草剂蛋白及其在植物育种中的应用: CN102586215A [P]. 2012-07-18.
- [60] 张保龙, 陈天子, 凌溪铁, 等. 一种 ALS 突变型基因及其在抗除草剂方面的应用: CN105779479A [P]. 2016-07-20.
- [61] Xu P L, Bu H Y, He M, et al. Glyphosate degrading enzyme gene and carrier containing said gene: 1392261 [P]. 2003-01-22.
- [62] 朱祯, 周敏. 一种水稻 EPSP 合酶突变体及其编码基因、获得方法与应用: CN1810962 [P]. 2006-08-02.
- [63] Shen Z C. Glyphosate-resistant gene and application thereof: CN101619318A [P]. 2010-11-15.
- [64] 沈志成, 林朝阳, 徐晓丽, 等. 高抗草甘膦突变基因及其改良方法和应用: CN102146371A [P]. 2011-08-10.
- [65] 田永生, 许晶, 姚泉洪, 等. 来源于苹果的 EPSP 合酶多位点突变体及其编码基因与应用: CN103205404A [P]. 2013-07-17.
- [66] 田永生, 许晶, 姚泉洪, 等. 草甘膦抗性提高的葡萄 EPSP 突变体的制备及其应用: CN104232600A [P]. 2014-12-24.
- [67] 刘坚. 抗草甘膦基因 MTP-SMG2-EPSPS 及其在培育抗草甘膦玉米中的应用: CN103409445A [P]. 2013-11-27.
- [68] 夏兰琴, 王根平, 林敏, 等. 抗草甘膦基因、专用表达载体及其在获得抗草甘膦转基因小麦中的应用: CN104004777A [P]. 2014-08-27.
- [69] 郭三堆, 孙豹, 张锐, 等. 一种含有草甘膦抗性基因的表达

- 载体及其应用: CN103981199A [P]. 2014 - 08 - 13.
- [70] 康越景, 郭明欣, 刘海利, 等. 用于检测除草剂耐受性玉米植物 DBN9877 的核酸序列及其检测方法: CN104878090A [P]. 2015 - 09 - 02.
- [71] 赖锦盛, 赵海铭, 宋伟彬. 一种高粱抗草甘膦 5 - 烯醇丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶 (EPSPS) 及其应用: CN102911950A [P]. 2013 - 02 - 06.
- [72] 赖锦盛, 赵海铭, 宋伟彬, 等. 转 *maroACC* 基因抗除草剂玉米 CC - 2 的侧翼序列及其应用: CN105331725A [P]. 2016 - 02 - 17.
- [73] Cui H, He Y, Wang J, et al. Cotton plant event a2 - 6 and primer and method for use in detection thereof: WO/2013/170399 [P]. 2013 - 11 - 21.
- [74] 王建胜, 崔洪志, 何云蔚. 抗草甘膦棉花事件以及用于其检测的引物和方法: CN106244587A [P]. 2016 - 12 - 21.
- [75] 张晓东, 江颖, 张立全, 等. 抗草甘膦筛选标记基因及其在玉米转基因技术中的应用: CN105886521A [P]. 2016 - 08 - 24.
- [76] Shen Z C, Lin C Y, et al. High resistance to glyphosate mutant gene and its improved method and application: WO/2012/097720 [P]. 2012 - 07 - 26.
- [77] 张先文, 王东芳, 沈志成. 一种具有草甘膦和草丁膦复合抗性的融合基因、编码蛋白及其应用: CN106318958A [P]. 2017 - 01 - 11.
- [78] 苏军, 王锋, 胡太蛟, 等. 一种双表达盒高抗草甘膦载体及其在水稻上的应用: CN105861541A [P]. 2016 - 08 - 17.