

# 田旋花 *EPSPS* 基因表达特征及草甘膦对其表达的影响

黄兆峰<sup>1</sup>, 白薇薇<sup>2</sup>, 周欣欣<sup>3</sup>, 黄红娟<sup>1</sup>, 姜翠兰<sup>1</sup>, 张朝贤<sup>1</sup>, 魏守辉<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; 2. 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室/新疆农业科学院植物保护研究所, 乌鲁木齐 830000; 3. 农业农村部农药检定所, 北京 100125)

**摘要** 采用实时荧光定量 RT-PCR 测定了田旋花不同组织、不同叶龄的 *EPSPS* 基因 mRNA 的相对表达量以及草甘膦对 *EPSPS* 基因相对表达量的影响。结果表明:田旋花 *EPSPS* 基因在不同组织表达量差异显著,在叶的表达量高于茎和根;该基因在 9 叶期的表达量最高,是 3 叶期的 1.5 倍;在草甘膦处理后,田旋花 *EPSPS* 基因的表达量先升高后降低,在处理 24 h 达最大值。随草甘膦剂量增加,该基因的表达量升高。研究结果可为深入解析田旋花对草甘膦耐药性机理提供参考。

**关键词** 田旋花; 草甘膦; *EPSPS*; 表达

**中图分类号:** S 482.4, S 451.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018372

## Expression pattern of *EPSPS* gene and the effect of glyphosate on its expression in field bindweed

HUANG Zhaofeng<sup>1</sup>, BAI Weiwei<sup>2</sup>, ZHOU Xinxin<sup>3</sup>, HUANG Hongjuan<sup>1</sup>,  
JIANG Cuilan<sup>1</sup>, ZHANG Chaoxian<sup>1</sup>, WEI Shouhui<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China;

3. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China)

**Abstract** Quantitative RT-PCR was employed to analyze the expression pattern of *EPSPS* gene in different tissues of the field bindweed *Convolvulus arvensis* at different leaf stages and the effect of glyphosate on the *EPSPS* gene expression. The results showed that the expression of *EPSPS* in leaves was higher than in roots and stems. The highest *EPSPS* expression level was observed at 9-leaf stage, 1.5 times as that at 3-leaf stage. After glyphosate treatment, *EPSPS* expression level increased first and then decreased, and the peak induction was detected at 24 h after glyphosate application. The *EPSPS* expression level was enhanced with increasing glyphosate dose. The results provide a reference for illuminating the mechanism of glyphosate tolerance in field bindweed.

**Key words** *Convolvulus arvensis*; glyphosate; *EPSPS*; expression

5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合成酶(*EPSPS*, EC 2.5.1.19)是莽草酸途径中的关键酶,莽草酸-3-磷酸(S3P)和烯醇式丙酮酸(PEP)在 *EPSPS* 的催化下转化为 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸(EPSP)<sup>[1]</sup>。草甘膦是目前应用最为广泛的广谱灭生性、内吸传导型除草剂<sup>[2]</sup>。它的作用方式是抑制 *EPSPS* 活性,阻断芳香族氨基酸如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的

生物合成,从而达到除草的目的<sup>[3]</sup>。由于草甘膦具有高效、低毒、低残留、无污染等优良特性,使其迅速成为耐除草剂转基因作物的首选药剂。随着耐草甘膦转基因作物的大面积种植和草甘膦的广泛使用,抗/耐草甘膦杂草将不断发生与发展,给农田杂草治理带来严峻挑战<sup>[4-5]</sup>。到目前为止,全球已有 42 种杂草对草甘膦产生了抗药性<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2018-08-30 修订日期: 2018-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(31501659);国家重点研发计划(2018YFD0200602);农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室(KFJJ20180104)

\* 通信作者 E-mail:shwei@ippcaas.cn

杂草对草甘膦的抗药性可以分为靶标抗性和非靶标抗性两方面<sup>[7]</sup>。其中,靶标 *EPSPS* 突变或过表达导致的抗药性占主要部分。

靶标 *EPSPS* 突变。草甘膦靶标 *EPSPS* 基因关键部位核苷酸被取代,导致氨基酸类型改变,进而引起 *EPSPS* 构象发生变化,致使草甘膦与 *EPSPS* 结合能力下降,最终导致药效降低<sup>[8-9]</sup>。牛筋草 *Eleusine indica*、多花黑麦草 *Lolium multiflorum* 的 *EPSPS* 106 位氨基酸由脯氨酸突变为丝氨酸(Pro-106-Ser)或苏氨酸(Pro-106-Thr),导致对草甘膦抗药性<sup>[10-11]</sup>。抗草甘膦牛筋草种群 *EPSPS* 同时存在 102 位(Thr-102-Ile)和 106 位(Pro-106-Thr)两个氨基酸取代,该种群表现出对草甘膦高抗性<sup>[12-13]</sup>。

*EPSPS* 过表达。*EPSPS* 基因拷贝数增加,过表达的 *EPSPS* 提供了充足的酶来满足正常生长发育的需要,从而表现出对草甘膦抗药性<sup>[14-15]</sup>。长芒苋 *Amaranthus palmeri*、意大利黑麦草 *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*、地肤 *Kochia scoparia* 等杂草的 *EPSPS* 基因在多个染色体上成倍扩增,这些杂草抗药性均是由于靶标 *EPSPS* 过表达导致<sup>[15-17]</sup>。耐草甘膦的狗肝菜 *Dicliptera chinensis* 和麦冬 *Ophiopogon japonicus* 经草甘膦处理后,*EPSPS* 在转录水平上提高,过表达的 *EPSPS* 解除了草甘膦的限制,增加了对草甘膦的耐药性<sup>[18-19]</sup>。

田旋花 *Convolvulus arvensis* L. 属旋花科旋花属杂草,该杂草具有庞大的根系,以地下根芽或种子进行繁殖,生命力极强,防除困难<sup>[20]</sup>。已被联合国粮农组织列为世界上 18 种危害最严重的杂草之一。同时,田旋花是最早报道的对草甘膦具有天然耐药性的杂草之一<sup>[21]</sup>,但其耐药性机制至今尚不明确。前期的研究发现田旋花 *EPSPS* 并无关键氨基酸位点突变<sup>[22]</sup>,由于 *EPSPS* 过表达是草甘膦抗/耐药性的重要机理之一,为探究 *EPSPS* 过表达是否在耐草甘膦田旋花中存在,本试验以田旋花为试材,比较了不同组织 *EPSPS* 基因表达差异,分析了不同叶龄田旋花 *EPSPS* 基因 mRNA 相对表达量以及草甘膦对 *EPSPS* 基因表达的影响,以期阐明田旋花对草甘膦耐药性机理提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

田旋花种子采自北京市海淀区上庄镇(116°17'E; 40°13'N)。种子经 80% 硫酸浸泡 30 min,洗净后清水浸泡 24 h,于恒温箱中 28℃ 催芽 12 h。选萌发生

势相同的种子,每个花盆(8 cm × 10 cm)中播种 6 粒,置于温室内培养(25℃/22℃,相对湿度 40%,光照 12 h)。待出苗后 2 叶期进行间苗,每盆保留 4 株长势一致的幼苗继续培养。研究 *EPSPS* 组织表达差异时,在田旋花子叶完全展开后取子叶样品,在田旋花 6 叶期时取根、茎和叶(植株顶部第 1~3 片叶)样品;研究田旋花不同叶龄 *EPSPS* 表达差异时,取植株顶部第 1~3 片叶;研究草甘膦对 *EPSPS* 表达影响时,将田旋花幼苗培养至 6 叶期,用不同剂量的草甘膦 461.25、922.5、1 845 g/hm<sup>2</sup> 进行茎叶喷雾处理,分别在处理后 12、24、36 和 48 h 取样,取植株顶部第 1~3 片叶(约 200 mg),取样后用液氮迅速冷冻,放入 -80℃ 冰箱中保存备用。每个样品或处理设生物学重复 3 次。

### 1.2 引物设计与合成

根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 登录的田旋花 *EPSPS* (EU698030) 和 18S rRNA (AJ236013.1) 基因序列设计两对特异性引物 *EPSPS*-f 和 *EPSPS*-r 及 18S rRNA-f 和 18S rRNA-r (表 1)。上述引物由北京六合华大公司合成。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	产物长度/bp Product length
<i>EPSPS</i> -f	GGTCCTTTCACCGTAACAC	220
<i>EPSPS</i> -r	GGGGAGGTCAGAAATACA	
18S rRNA-f	AGAAACGGCTACCACATC	251
18S rRNA-r	CCATCCCAAAGTCCAAC	

### 1.3 田旋花总 RNA 提取及 cDNA 的合成

按照离心柱式植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技公司)的说明提取田旋花不同组织及草甘膦处理后叶片的总 RNA。凝胶电泳检测合格后,用于 cDNA 的合成。以总 RNA 为模板,用 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)反转录得到 cDNA,于 -20℃ 保存备用。

### 1.4 荧光定量 PCR 分析 *EPSPS* 表达

采用 ABI7500 实时定量 PCR 仪,以 cDNA 为模板,按照 SYBR Green PCR Master Mix 使用说明进行 PCR 扩增。反应体系为:12.5 μL 2 × SYBR Green,1 μL cDNA,0.5 μL 引物,补水至总体积 25 μL。反应程序为:95℃ 15 s,62℃ 25 s,30 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和熔解曲线。*Ct* 值取平均值。以  $\Delta\Delta C_t$  法来计算 *EPSPS* 的表达量。18S rRNA 在不同组织及草甘膦处理后表达稳定,

故该基因被选作内参基因<sup>[22]</sup>。

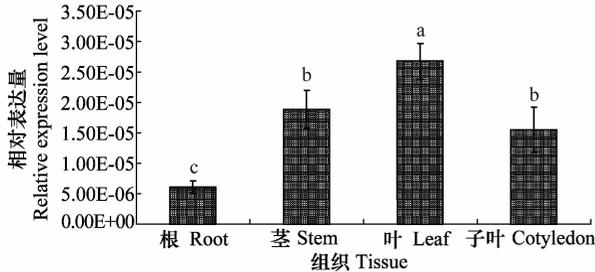
### 1.5 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 数据分析软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 田旋花不同组织 *EPSPS* 基因表达特征

以田旋花根、茎、叶和子叶为试验材料,测定了 *EPSPS* 基因在不同组织的表达特征。如图 1 所示, *EPSPS* 基因在田旋花不同组织中表达量差异显著。在叶中表达量最高,显著高于在其他组织中的表达量,其次是茎和子叶,在根中的表达量最低。 *EPSPS* 基因在茎和子叶中的表达量与在根中的表达量差异也达显著水平。



不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。下同  
Different letters indicate significant difference at 0.05 levels, respectively. The same below

图 1 田旋花不同组织中 *EPSPS* 相对表达量

Fig. 1 Relative expression level of *EPSPS* in different tissues of field bindweed

### 2.2 *EPSPS* 基因在田旋花不同叶龄表达特征

田旋花在不同叶龄分别取顶部第 1~3 片叶用于 *EPSPS* 基因表达量检测。结果如图 2 所示,田旋花 *EPSPS* 基因在 3、6、9、12 叶期表达量有差异。在 9 叶期的相对表达量最高,是表达量最低的 3 叶期的 1.5 倍, *EPSPS* 基因在田旋花 9 叶期和 12 叶期的表达量差异不显著。

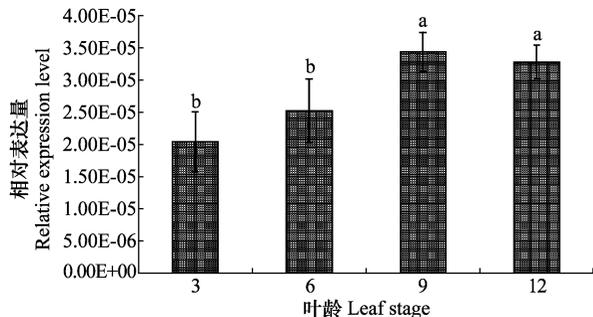


图 2 不同叶龄田旋花 *EPSPS* 相对表达量<sup>[1]</sup>

Fig. 2 Relative expression levels of *EPSPS* at different leaf-stages of field bindweed

### 2.3 草甘膦处理对田旋花 *EPSPS* 基因表达的影响

以不同剂量草甘膦处理过的田旋花叶片(6 叶期时顶部第 1~3 片叶)为试材,利用实时荧光定量 PCR 分析了草甘膦对 *EPSPS* 基因表达的影响。结果显示,田旋花 *EPSPS* 基因在草甘膦(922.5 g/hm<sup>2</sup>)处理后呈先升高后降低的趋势,在处理后 24 h 时表达量达到最高,约为未处理时的 12 倍,之后逐渐下降(图 3)。随着草甘膦剂量的提高,田旋花 *EPSPS* 基因表达呈增加趋势。

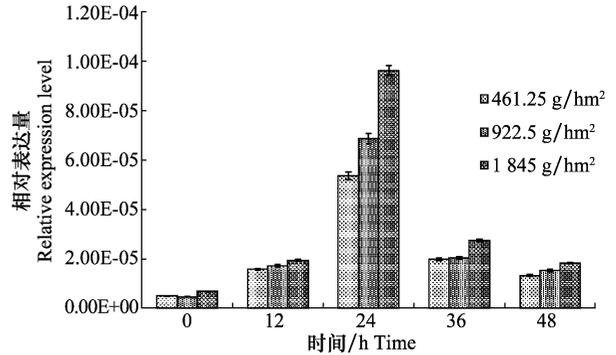


图 3 草甘膦处理对田旋花 *EPSPS* 表达的影响

Fig. 3 Expression levels of *EPSPS* in field bindweed induced by glyphosate

## 3 讨论

目前,化学除草仍是世界各国防控杂草的主要方式之一。过度依赖化学除草不但造成抗性杂草的发生和发展,而且会对生态环境产生负面影响。在倡导农药减量、环境保护和绿色发展的背景下,如何防控抗性杂草的发生和发展是当前杂草科学研究的重要内容。而阐明杂草对除草剂抗药性的内在机制,尤其是解析杂草对世界第一大除草剂草甘膦的抗/耐药性机制是杂草抗药性研究的首要任务。

为阐明田旋花对草甘膦的天然耐药性机制,作者在前人研究的基础上推测田旋花对草甘膦耐药性可能与靶标 *EPSPS* 基因过表达相关。植物不同器官对芳香族氨基酸的需求是不同的,而芳香族氨基酸是莽草酸途径中的产物, *EPSPS* 酶是莽草酸途径中的关键酶,因此 *EPSPS* 基因在不同组织器官中的表达量可能不一致<sup>[23]</sup>。本研究利用荧光定量方法对田旋花 *EPSPS* 基因在不同组织中的表达模式进行了分析。结果表明, *EPSPS* 基因在田旋花根、茎、叶和子叶均有表达,说明 *EPSPS* 基因的表达不具有组织特异性。这一结果与在藎白<sup>[24]</sup>中 *EPSPS* 的表达相一致。田旋花 *EPSPS* 基因在叶中表达量最高,在陆地棉<sup>[23]</sup>中也得到了同样的结果。

在外界因子胁迫下,植物体感受外界胁迫信号

而启动或关闭某些基因的表达,以抵御逆境的危害,保证植物细胞的正常生理功能和植物体生长发育。研究表明:植物体内 *EPSPS* 基因的过量表达可以提高对草甘膦的耐受性<sup>[15-17]</sup>。棉花品系 Y18 在受到草甘膦的胁迫作用时,植物体内的 *EPSPS* 酶表达量呈现增加的趋势<sup>[25]</sup>。Shyr 等<sup>[26]</sup>发现,胡萝卜在含有草甘膦的培养基上培养,*EPSPS* 基因的转录水平明显增加。此外在狗肝菜和麦冬等杂草中均发现了草甘膦处理导致 *EPSPS* 基因表达上调的现象<sup>[18-19]</sup>。但是,长芒苋的 *EPSPS* 基因表达不受草甘膦处理的影响<sup>[15]</sup>。本研究表明:草甘膦处理可以引起田旋花 *EPSPS* 表达量的提高,并且随着草甘膦剂量的增加,*EPSPS* 表达量也升高,这可能是田旋花对草甘膦耐药性的分子机制。

基因的表达调控受启动子和转录因子调节。田旋花在草甘膦处理后,*EPSPS* 基因上调表达可能与启动子顺式作用元件或相关转录因子有关。从 *EPSPS* 基因启动子和转录因子入手探究田旋花耐草甘膦更深层次的机理将是下一步研究重点。

## 参考文献

[1] HERRMANN K M, WEAVER L M. The shikimate pathway [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50:473 - 503.

[2] 张朝贤,房峰,张猛,等. 草甘膦应用现状及杂草抗性研究与治理对策[J]. 中国农药,2011(8): 22 - 26.

[3] STEINRUCKEN H C, AMRHEIN N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980, 94:1207 - 1212.

[4] 李香菊,崔海兰. 转基因耐草甘膦作物的环境安全性[J]. 植物保护, 2011,37(6):38 - 43.

[5] 张朝贤,黄红娟,崔海兰,等. 抗药性杂草与治理[J]. 植物保护, 2013, 39(5):99 - 102.

[6] HEAP I. The international survey of herbicide resistant weeds [EB/OL]. www. weedscience. com. Accessed Aug 20, 2018.

[7] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 317 - 347.

[8] CHEN Jingchao, HUANG Hongjuan, ZHANG Chaoxian, et al. Mutations and amplification of *EPSPS*, gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) [J]. Planta, 2015, 242(4):859 - 868.

[9] KOO D H, JUGULAM M, PUTTA K, et al. Gene duplication and aneuploidy trigger rapid evolution of herbicide resistance in common waterhemp [J]. Plant Physiology, 2018, 176(3):1932 - 1938.

[10] BAERSON S R, RODRIGUEZ J, TRAN M, et al. Glyphosate-resistant goosegrass identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J].

Plant Physiology, 2002, 129: 1265 - 1275.

[11] FIDEL G T, JAVIER G H FRANCISCO B, et al. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 58:16 - 22.

[12] YU Qin, JALALUDIN A, HAN Heping, et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance [J]. Plant Physiology, 2015, 167(4):1440.

[13] CHEN Jingchao, HUANG Hongjuan, WEI Shouhui, et al. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) by RNA sequencing technology [J]. Plant Journal, 2017, 89(2):407.

[14] POWLES S B. Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution [J]. PNAS, 2010, 107(3): 955 - 956.

[15] GAINES T A, ZHANG W, WANG D, et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* [J]. PNAS, 2010, 107:1029 - 1034.

[16] SALAS R A, DAYAN F E, PAN Z Q, et al. *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas [J]. Pest Management Science, 2012, 68: 1223 - 1230.

[17] WIERSMA A T, GAINES T A, PRESTON C, et al. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia* [J]. Planta, 2015, 241(2):463 - 474.

[18] YUAN C I, CHAING M Y, CHEN Y M. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis* [J]. Plant Science, 2002, 163(3): 543 - 554.

[19] MAO Chanjuan, XIE Hongjie, CHEN Shiguo, et al. Multiple mechanism confers natural tolerance of three lilyturf species to glyphosate [J]. Planta, 2016, 243(2):321 - 335.

[20] JAMES H, WESTWOOD C N, YERKES F P, et al. Absorption and translocation of glyphosate in tolerant and susceptible biotypes of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) [J]. Weed Science, 1997, 45: 658 - 663.

[21] HUANG Zhaofeng, ZHANG Chaoxian, HUANG Hongjuan, et al. Molecular cloning and characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Convolvulus arvensis* L [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(4):2077 - 2084.

[22] 张猛. 田旋花(*Convolvulus arvensis* L.)对草甘膦耐药性机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.

[23] 童旭宏,吴玉香,祝水金. 陆地棉 *EPSPS* 基因的克隆及其组织特异性表达分析[J]. 棉花学报, 2009, 21(4): 259 - 264.

[24] 蒋向,戴雄泽,李育强,等. 薹白 *EPSPs* 基因在不同组织表达的半定量分析[J]. 湖南农业大学学报, 2007(5): 542 - 545.

[25] 刘东军,张锐,郭三堆,等. 棉花品系 Y18 在草甘膦胁迫下的 *epsps* 基因表达分析研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008(10):55 - 59.

[26] SHYR Y Y, HEPBURN A G, WIDHOLM J M. Glyphosate selected amplification of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in cultured carrot cells [J]. Molecular and General Genetics, 1992, 232(3):377 - 382.