

表达细菌阿特拉津氯水解酶基因的转基因烟草对土壤中阿特拉津的生物降解

斯华敏¹, 朱 丽¹, 牟仁祥², 刘文真¹, 胡国成¹, 付亚萍¹, 陈铭学², 蔡宝立³, 孙宗修¹

(1. 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006, 2. 中国水稻研究所农业部稻米及制品质量监督及检验测试中心, 浙江 杭州 310006, 3. 南开大学微生物学系, 天津 300071)

摘要:植物修复(Phytoremediation)技术是消除或减少土壤环境中有机污染物的重要手段, 本研究采用植物转基因技术对土壤中除草剂阿特拉津的降解进行了探索。通过农杆菌介导将阿特拉津氯水解酶基因 *ADI-atzA* 转入烟草中, 获得了转基因植株。T₁ 代植株在浇灌了 20 mg·L⁻¹ 阿特拉津溶液的模拟污染土壤条件下生长 45 d, 抗性植株的 RT-PCR 结果证实叶片中阿特拉津氯水解酶基因得到正常转录, 液相色谱质谱分析在叶片中检出阿特拉津的水解产物羟基阿特拉津。结果表明, 用转基因植物修复阿特拉津污染土壤是值得进一步探索的途径。

关键词:阿特拉津; 生物降解; 阿特拉津氯水解酶基因; 转基因烟草; 植物修复; 环境生物技术

中图分类号: X53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0596-06

Biodegradation of Atrazine in Soil by Transgenic Tobacco Plants Expressing Bacterial Atrazine Chlorohydro-lase Gene

SI Hua-min¹, ZHU Li¹, MU Ren-xiang², LIU Wen-zhen¹, HU Guo-cheng¹, FU Ya-ping¹, CHEN Ming-xue², CAI Bao-li³, SUN Zong-xiu¹

(1. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute (CNRRI), Hangzhou 310006, China; 2. Rice Product Quality and Supervision Testing Center, Ministry of Agriculture, CNRRI, Hangzhou 310006, China; 3. Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Atrazine, the most widely used herbicide in the world, is one of the persistent toxic substances (PTS). Atrazine chlorohydrolase, encoded by atrazine chlorohydrolase gene, can catalyze the conversion of toxic atrazine to nontoxic hydroxyatrazine. In our previous study, the bacterial atrazine chlorohydrolase gene (*ADI-atzA*) was cloned from *Arthrobacter* sp. strain AD1 and inserted into the expression vector p1301-*atzA*. In order to explore the effect of transgenic tobacco plants expressing *ADI-atzA* gene on biodegradation of atrazine, in this study, the *ADI-atzA* gene was introduced into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and total of 102 plants were obtained. PCR analysis confirmed that the *ADI-atzA* gene was integrated into the genome of 74% of T₀ plants. T₁ transgenic plants were used for atrazine resistance experiment. The results showed that some of transgenic lines grew well on soil irrigated with 20 mg·L⁻¹ atrazine even treated for 45 days while the nontransgenic tobacco plants died completely under the same condition after 7 days. The survivable T₁ transgenic tobacco plants were used for further analysis. RT-PCR analysis indicated that *ADI-atzA* gene was expressed normally in transgenic plants and hydroxyatrazine was discovered in transgenic plants leaves by HPLC-MS method. However, neither RT-PCR band nor hydroxyatrazine was detected in wild-type tobacco leaves. These results proved that it was feasible to apply transgenic plants harbored *ADI-atzA* gene to phytoremediation of atrazine-contaminated soils.

Keywords: atrazine; biodegradation; *atzA*; transgenic tobacco; phytoremediation; environmental biotechnology

收稿日期: 2007-08-03

基金项目: 浙江省自然科学基金(X306649)

作者简介: 斯华敏(1957—), 女, 浙江杭州人, 实验师, 主要从事水稻生物技术研究。E-mail: shm1002@126.com

通讯作者: 孙宗修 E-mail: sunzx405@163.com

转基因植物从1983年问世到1996年在世界范围进入规模化生产,历时13 a。此后种植面积连续10 a以超过10%的速度递增,2007年达到1.143亿 hm^2 ,根据科学时报2008年2月28日最新报道,成为全球推广速度最快的农业生产技术。在转基因农作物中,抗除草剂转基因作物因避免或减轻了除草剂对农作物的伤害,使大规模使用除草剂、大幅度减轻农民的劳动强度成为可能,因此深受农民欢迎,也给公司带来了巨额利润。据农业生物技术应用国际服务组织(ISAAA)统计,抗除草剂转基因作物始终在转基因作物中独占鳌头,2006年抗除草剂转基因作物(大豆、玉米、油菜、棉花和苜蓿)的种植面积达到6990 hm^2 ,占当年转基因作物总面积的68%^[10]。然而转基因作物是一把双刃剑,大规模种植抗除草剂转基因作物使施用除草剂更加无所节制,加剧了土壤、地下水的有机污染,其结果使本来已经相当脆弱的生态环境雪上加霜,亟待治理。

阿特拉津(atrazine,商品名为莠去津)是一种在世界范围内广泛使用的三嗪类除草剂,用于玉米、高粱、甘蔗等作物的杂草防除。国外使用该除草剂已有50 a历史,阿特拉津是美国用量最大的除草剂,2003年达3.4万t。由于阿特拉津使用量大、残留期长(半衰期为244 d),对后茬作物(如小麦)毒害强、污染范围广(水环境、土壤、大气)、具有生物累积性、难以降解、可远距离传输、致癌致突变性和内分泌干扰等特性,被联合国环境规划署列为28种持久性有毒化学物质(PTS)之一^[21]。近年来有关美洲豹蛙等两栖类蝌蚪长期暴露在阿特拉津水域导致性腺发育异常、死亡率提高的研究结果^[6,16]引起人们更多的担忧。我国从80年代初开始使用阿特拉津,目前每年的产量约为2万t,阿特拉津污染形势十分严峻。

当前消除有机污染主要有物理、化学和微生物方法,但因种种原因尚难以应用于大田有机污染的治理。植物修复(Phytoremediation)由于其运作成本低、操作简便、适合大规模集约化应用、生态效益显著等特点,已引起广泛重视。但是自然界能有效降解有机污染物的植物不多,因此利用转基因技术,将微生物等其他物种中高效降解污染物的基因导入植物,应用转基因植物修复污染环境正在成为环境生物技术的一个新的重要研究方向^[13,20]。

利用转基因技术进行有效的植物修复,首先需要高效的功能基因使除草剂降解为无毒的中间产物,其次还需要合适的受体(容易转化、适应性强、根系发

达、生长迅速、生物量大)。治理污染农田的目的是使农业可持续发展,因此在污染的农田上大规模种植多年生植物,特别是木本植物的观点^[3]是不可取的;同时为了防止外来物种入侵造成新的生态和环境问题,选择作物较合适。国内外对植物修复被污染环境进行了大量研究。Snellinx等^[18]报告转基因烟草对爆炸物GTN和TNT的耐性比对照约高10倍,且降解速度比对照快2倍。Doty等^[4]将人细胞色素P450的转录因子转移到烟草中,转基因烟草分解三氯乙烯的速度比对照高出640倍。还有学者报告了转基因烟草、水稻分解绿麦隆、对氯乙酰苯胺类和阿特拉津等除草剂的效果^[11,12,17,22]。然而从总体上看,尽管对植物修复的期待很高,但关于转基因植物修复有机污染的研究报告还很有限,国内还鲜见关于转基因植物修复有机污染的研究报告。

在前期研究中蔡宝立等从以阿特拉津为惟一氮源生长的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)菌株AD1中分离和鉴定了具有自主知识产权的阿特拉津氯水解酶基因 $AD1-atzA$ ^[1,2],继而构建阿特拉津氯水解酶基因植物表达载体p1301- $atzA$ 并转化水稻^[23]。本研究通过农杆菌介导获得转 $AD1-atzA$ 基因的烟草植株, T_1 代植株在喷洒过阿特拉津的模拟条件下进行转基因植物修复污染土壤的试验,本文报道研究的结果期望为转基因植物修复有机污染环境积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

用于转基因的植物材料为三生烟(*Nicotiana tabacum*, cv. Samsun),由农杆菌介导的遗传转化方法获得。

1.1.2 液相色谱质谱分析所用试剂

甲醇(色谱纯)购自德国Merck公司,羟基阿特拉津和阿特拉津标准品购自Dr.Ehrenstorfer GmbH公司,标准贮备液均用0.1%的磷酸溶液配制成100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,于4℃保存。

1.1.3 质粒和根癌农杆菌

表达载体p1301- $atzA$ 为本实验室前期所构建^[23],农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*菌株为EHA105。

1.2 方法

1.2.1 烟草的转化

烟草叶圆片农杆菌感染参照Horsh等^[8]的方法并有所修改。取温室栽培的苗龄约1个月的烟草叶片,

无菌水冲洗,70%乙醇表面灭菌 1 min,0.1%升汞浸泡 2~3 min,无菌水冲洗 5 次,无菌滤纸吸干表面水分。剪去叶缘和主脉后将叶片剪成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块,置于 MS 培养基上预培养 3 d,当切口开始膨大时用含有 p1301-*atzA* 表达载体的农杆菌菌液浸泡 5~10 min,期间不时轻轻晃动。取出经农杆菌侵染的叶圆片,在无菌滤纸上吸干,将侵染过的叶片放入 MS 培养基上 25 ℃暗培养 2 d。经共培养的叶圆片再转入含 50 mg·L⁻¹ 潮霉素和 300 mg·L⁻¹ 头孢霉素的 MS 筛选培养基上进行选择培养,每两周继代一次。待抗性芽长到 1 cm 以上时切下小芽并切除芽基部的愈伤组织,转移到含有 50 mg·L⁻¹ 潮霉素和 150 mg·L⁻¹ 头孢霉素的 1/2 MS 生根培养基上。待抗性芽长至根系发达的健壮小苗后移栽于钵钵中,常规管理。开花后单株收种。常规播种获得 T₁ 代转基因植株。

1.2.2 转基因植物的 PCR 检测

基因组 DNA 采用 CTAB^[15]方法从转基因植株的叶片中提取。以基因组 DNA 为模板扩增目的基因。15 μL 反应体系包括 1×PCR buffer, 2 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.17 mmol·L⁻¹ dNTPs, 0.33 μmol·L⁻¹ 引物,0.6 U Taq 酶 (TaKaRa) 及 100 ng 模板 DNA。ABI 9600 PCR 仪上进行 PCR 扩增,反应条件为:94 ℃下预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,退火(退火温度随引物各异)30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后在 72 ℃下延伸 10 min。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色后紫外灯下观察。PCR 扩增引物由北京奥科公司合成,序列见表 1。

1.2.3 RT-PCR 分析

取烟草新鲜叶约 200 mg 于液氮中研磨提取总 RNA,具体操作参见上海生物工程有限公司 RNA 提取试剂盒操作说明。提取的总 RNA 样品用 RNase-free 的 DNase (Promega, USA) 于 37 ℃下消化 30 min,消化体系包括:40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1 U RQ1 RNase-

Free DNase, 300 ng 模板 total RNA。然后加 1 μL RQ1 DNase Stop Solution (20 mmol·L⁻¹ EGTA pH 8.0) 于 65 ℃下 10 min,终止反应。消化后的 RNA 样品进行反转录反应,反应体系为:5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1×RT-PCR buffer, 1 mmol·L⁻¹ each dNTP Mixture, 10 U RNase Inhibitor, 2.5 U AMV Reverse Transcriptase, 2.5 pmol·μL⁻¹ Random 9 mers, 120 ng total RNA 模板。按如下条件反应:30 ℃, 10 min;42 ℃, 30 min;99 ℃, 5 min;5 ℃, 5 min。以反转录产物为模板进行 PCR 扩增,50 μL 反应体系包括:1×PCR buffer (TaKaRa), 5 U TaKaRa Ex TaqTM HS, 0.33 μmol·L⁻¹ Primer, 反转录 cDNA 第一链反应产物 5 μL (约 60 ng)。ABI 9600 PCR 仪上进行 PCR 扩增,反应条件为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,退火(退火温度随引物各异)30 s,72 ℃延伸 1 min,40 个循环;最后在 72 ℃下延伸 10 min。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色后紫外灯下观察。

1.2.4 烟草植株对阿特拉津的耐受浓度试验

任选 3 个转基因株系经 PCR 检测,选出转基因阳性的 T₁ 代植株,移栽于直径 26 cm 的花盆中,每株系 5 盆,每盆 1 株。每个花盆中的干土重量一致(5 kg)。6 叶期开始以不同浓度(60、40、20、10 和 0 mg·L⁻¹)的阿特拉津溶液分别浇灌每个株系的 5 盆烟草植株,以非转基因的原始品种为对照同时处理。

阿特拉津原药(粉剂,含量 96.8%,长兴第一化工厂生产,批号为 20050510)由浙江省化工院提供。

1.2.5 植株体内羟基阿特拉津的检测

T₀ 代植株的种子按株系播于塑料周转箱中,每箱 2 个株系。3 叶期适当间苗并开始浇灌浓度为 20 mg·L⁻¹ 的阿特拉津溶液,每周 1 次,每次每箱浇灌 1 000 mL,先后共浇灌 5 次。设仅浇灌不含阿特拉津的清水为空白对照。

45 d 后取成活植株的叶片用于检测体内的羟基阿特拉津。烟草叶片经过碾磨捣碎后,称取 2.0 g 均匀

表 1 转基因烟草 PCR 及 RT-PCR 检测所用引物

Table 1 PCR and RT-PCR primers for detection of transgenic tobacco plants

基因 Target gene	引物序列 Sequence of primer	产物 Product/ bp		退火温度 Anneal T _m /℃
		基因组 Genomic DNA	cDNA	
<i>atzA</i>	P1 5'-TTTCCTCAAGGGCGGCGGAAGC TTCAACGGCGTCATTTTC-3'	1 500	1 500	56
	P2 5'-TGCGGGATGACCACCGAATTCCG GTGCAGGTTTTTCGATG-3'			
<i>actin</i> (<i>tob93</i>)	<i>actin</i> P1 5'-GGCTGTTCTTTCCTCTATGC-3'	412	280	52
	<i>actin</i> P2 5'-TTGCTGTTTCAAGTCTTGT-3'			

试样(精确到 0.01 g)于 15 mL 离心管中,加入 10.0 mL 水,经超声振荡提取 30 min,取 1 mL 提取液过 0.22 μm 滤膜,用液相色谱质谱仪(HPLC-MS,美国 Agilent 公司)测定。

主要参数如下:

色谱柱:C18 柱,3.0 μm ,150 mm $\times$ 2.1 mm;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 2 μL ;离子源;电喷雾 ESI;离子源温度:350 $^{\circ}\text{C}$;电喷雾电压:3 000 V。根据选择离子丰度比和保留时间定性,外标法定量。定量/定性离子:198.0/199.0(羟基阿特拉津,丰度比 100:10)。流动相及流速见表 2。

表 2 HPLC-MS 检测羟基阿特拉津的工作参数

Table 2 Working parameters of HPLC-MS used for detecting hydroxyatrazine

时间 Time/min	流速 Speed/mL $\cdot$ min $^{-1}$	水 H ₂ O/%	甲醇 Methanol/%
0.00	0.300	80.0	20.0
10.00	0.300	20.0	80.0
14.00	0.300	20.0	80.0
14.10	0.300	80.0	20.0
25.00	0.300	80.0	20.0

2 结果与分析

2.1 转基因烟草植株的获得和 T₁ 代植株抗性试验

用农杆菌转化烟草叶圆片 212 片,共获得 T₀ 代转基因植株 102 个,经 PCR 检测,再生植株的阳性率 74%(图 1)。将经过 PCR 检测的 T₁ 代转基因植株用浓度 60、40、20、10 和 0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的阿特拉津溶液浇灌,非转基因植株在 20~60 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 阿特拉津处理后叶片出现褪绿并迅速枯萎,7 d 后全株枯萎死亡。对 10 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 阿特拉津处理的反应较迟钝,5 d 后褪绿,10 d 后开始枯萎并逐渐死亡。转基因植株对阿特拉津处理表现不同程度的耐受能力,普遍表现为对 10 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 阿特拉津的处理有较强的耐受能力,株系 A26 在 40 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 与 60 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 阿特拉津处理 13 d 后仍然鲜绿。但是有的株系(如 A5)对阿特拉津的反应与非转基因植株相仿,也很敏感(照片未显示)。由于 10 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的阿特拉津不能在短期内完全杀死非转基因植株烟草,因此在后续试验中选用 20 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的阿特拉津溶液进行处理。

2.2 转基因 T₁ 代植株 *atzA* 基因的表达

T₀ 代的种子按株系播于塑料周转箱中,3 叶期后开始浇灌浓度为 20 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的阿特拉津溶液,营造阿特拉津污染土壤的模拟环境。由于 T₁ 代是分离群体,

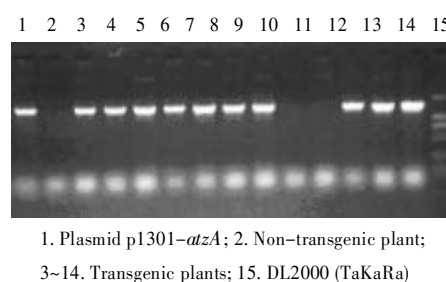


图 1 T₀ 代转基因植株 *atzA* 的 PCR 检测

Figure 1 PCR assay for detection of *atzA* in T₀ transgenic tobacco plants

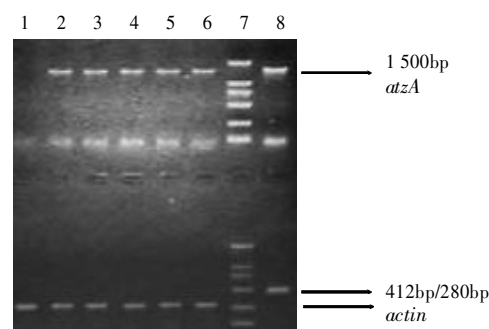
有相当一部分植株死亡。45 d 后成活植株按单株取叶片,提取叶片 RNA,RT-PCR 检测阿特拉津氯水解酶基因 *atzA* 的表达。结果表明,*atzA* 基因在转基因烟草中得到正常表达(图 2)。

2.3 转基因烟草叶片中羟基阿特拉津的检测

RT-PCR 检测阳性植株中随机选择了 2 个植株,取叶片用于检测体内的羟基阿特拉津。液相色谱质谱在转基因烟草中检出目标产物—羟基阿特拉津,而生长在未浇灌阿特拉津溶液的土壤上的野生型对照未检出羟基阿特拉津(图 3),这一结果与 RT-PCR 检测结果一致。检测结果成功表明转基因烟草具有吸收土壤中残留的阿特拉津并将其水解脱氯,降解为无毒的羟基阿特拉津的能力。

3 讨论

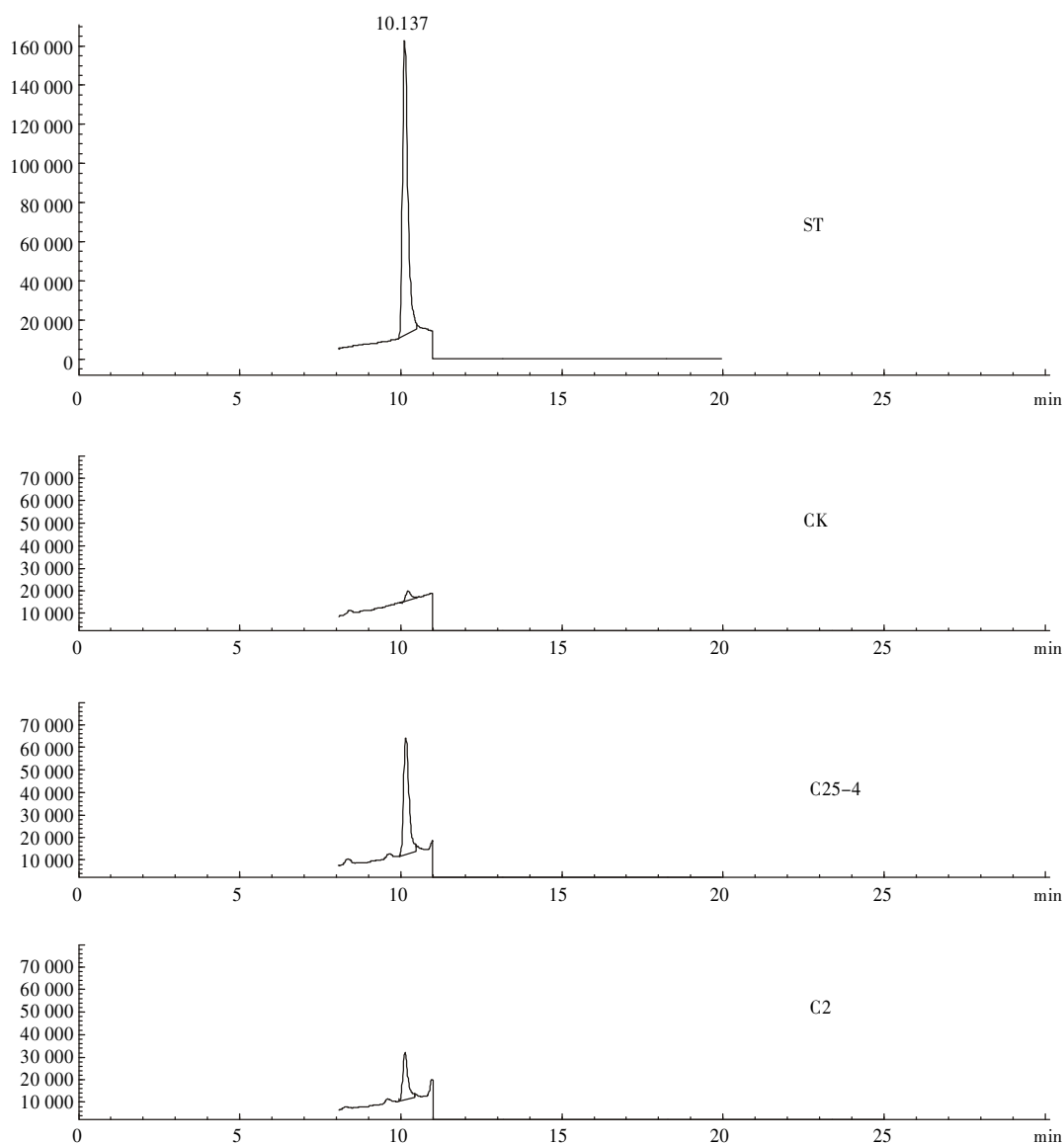
除草剂的发明和推广使农民摆脱了繁重而低效的劳动,当今不但大规模的农业生产离不开除草剂,而且城市绿化,公路、铁路沿线,河流、渠道沿岸,电力设施和娱乐场地都广泛使用除草剂,产生了明显的经



1: Non-transgenic plant; 2~6: Transgenic plants(cDNA amplification); 7: DL2000; 8: Transgenic plants(genomic DNA amplification)

图 2 T₁ 代转基因烟草 RT-PCR 检测

Figure 2 RT-PCR analysis for detection of T₁ transgenic tobacco plants



ST: HPLC-MS standard curve of hydroxyatrazine; CK: Wild type; C2 and C25-4: T₁ generation of transgenic lines.

图3 HPLC-MS 检测转基因烟草中的羟基阿特拉津

Figure 3 HPLC-MS analysis for the detection of hydroxyatrazine in T₁ transgenic tobacco plants

济效益和景观效益。抗除草剂基因的克隆使除草剂的应用进入新的阶段,从最初作为选择标记、报告基因、农田除草等直接利用拓展到杂交水稻,为解决杂交稻制种纯度和机械化制种找到了全新的途径^[5,9],除草剂和抗除草剂基因的研究和应用显著推动了生产和科学研究,但是除草剂的滥用也对生态环境造成了严重危害。

利用抗性基因的解毒机制,构建高效去除污染物的转基因农作物,是植物修复被污染环境的一个重要途径。目前,国际上对持久性有机污染毒物阿特拉津的植物修复研究多数采用人细胞色素 P450 家族的基

因^[4,12]。1995 年美国明尼苏达大学 Wackett 实验室分离到能够降解阿特拉津的假单胞菌 ADP 菌株(*Pseudomonas* sp. strain ADP),阐明了阿特拉津的代谢途径,克隆和测序了降解 Atrazine 第一个关键酶—阿特拉津氯水解酶基因 *atzA*,从而为根据代谢途径开展植物修复试验奠定了基础^[14,19]。最近他们报告转 *atzA* 基因的苜蓿和烟草在含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿特拉津的水溶液中培养后用薄层层析检出羟基阿特拉津,证明转基因植物能降解阿特拉津^[22]。本研究用液相色谱质谱方法证明转 *AD1-atzA* 基因的烟草在浇灌 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿特拉津的模拟重度污染土壤上生长 45 d 后,通过

阿特拉津氯水解酶 *atzA* 使阿特拉津脱氯成为无毒的羟基阿特拉津,分子生物学研究也证明 *AD1-atzA* 基因正常表达。本研究与 Wang 的试验相比,更接近实际,降解效果也十分直观和明显,表明克隆、改造 *atzA* 基因并使之在植物体中高效遗传表达,可能成为植物修复阿特拉津污染环境的重要途径。

国内在利用抗除草剂基因方面进行了大量研究^[5,9,23],但是在利用转基因技术治理有机污染方面还是空白。本研究利用自主克隆的基因进行植物修复有机污染的探索,是一次有益的尝试。当然,用转基因植物修复有机污染环境(水体和土壤)还有许多问题需要解决,首先是可用于植物修复的基因还太少;其次,目的基因的表达量需要提高,适宜的植物和植物特异表达部位也需要筛选,此外还要避免外源基因对受体植物体内正常代谢过程的干扰以及转基因安全等等,所有这些都有待于探索和反复试验。

参考文献:

- [1] 蔡宝立, 黄今勇, 石建党, 等. 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 22-26.
CAI B L, HUANG J Y, SHI J D, et al. Isolation and identification of atrazine-degrading strains[J]. *Microbiology*, 2001, 28(2): 22-26.
- [2] Cai B, Han Y, Liu B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36: 272-276.
- [3] Chang S W, Lee S J, Je C H. Phytoremediation of atrazine by poplar trees: toxicity, uptake, and transformation[J]. *J Environ Sci Health B*, 2005, 40(6): 801-811.
- [4] Doty S L, Shang T Q, Wilson A M, et al. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6287-6291.
- [5] 傅亚萍, 肖 晗, 朱正歌, 等. 应用基因工程实现杂交稻制种机械化的初步研究[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(2): 97-100.
FU Y P, XIAO H, ZHU Z G, et al. Primary study on mechanization of seed production of inducing bar gene to Pei'ai 64S [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15(2): 97-100.
- [6] Hayes T, Haston K, Tsui M, et al. Herbicides: feminization of male frogs in the wild [M]. *Nature*, 2002a, 419: 895-896.
- [7] Hayes T B, Collins A, Lee M, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002b, 99: 5476-5480.
- [8] Horsh R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227: 1229-1231.
- [9] 黄大年, 李敬阳, 章善庆, 等. 用抗除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度的新技术[J]. 科学通报, 1998, 43(1): 67-70.
HUANG D N, LI J Y, ZHANG S Q, et al. A new technique for fast detecting and improving the purity of hybrid rice seeds using herbicide resistant gene [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(1): 67-70.
- [10] ISAAA. ISAAA Brief 35-2006: Executive Summary, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006, <http://www.isaaa.org> 2007.
- [11] Karavangeli M, Labrou N E, Clonis Y D, et al. Development of transgenic tobacco plants over expressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation[J]. *Biomol Eng*, 2005, 22(4): 121-128.
- [12] Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19 [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 2985-2991.
- [13] Kramer U. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(2): 133-141.
- [14] Martinez B, Tomkins J, Wackett L P, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5684-5697.
- [15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nuclear Acids Res*, 1980, 8: 4321-4325.
- [16] Rohr J R, Sager T, Sesterhenn T M, et al. Exposure, postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114: 46-50.
- [17] Shiota N, Kodama S, Inui H, et al. Expression of human cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in transgenic tobacco plants[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 2025-2033.
- [18] Snellinx Z, Nepovim A, Taghavi S, et al. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2002, 9(1): 48-61.
- [19] De Souza M L, Sadowsky, Wackett L P. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178: 4894-4900.
- [20] Suresh B, Ravishankar G A. Phytoremediation—a novel and promising approach for environmental clean-up[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2004, 24: 97-124.
- [21] UNEP CHEMICALS. Regionally based assessment: global report 2003. Geneva, Switzerland. 2003. 211.
- [22] Wang L, Samac D A, Shapir N. Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene [J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 475-486.
- [23] 王松文, 施利利, 孙宗修, 等. 农杆菌介导的细菌阿特拉津氯水解酶基因对水稻的转化研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1093-1098
WANG S W, SHI L L, SUN Z X, et al. Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) with *atzA* gene[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(8): 1093-1098.

致谢: 本研究得到浙江省自然科学基金(X306649, 抗除草剂阿特拉津的转基因水稻的研究)的资助。浙江省化工院提供除草剂阿特拉津原粉, 特致谢忱。