

提高植物磷营养效率(候选)基因研究进展

李喜焕, 常文锁, 张彩英

(河北农业大学/教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 保定 071001)

摘要: 低磷限制植物产量提高和品质改良是全球亟待解决的土壤养分问题之一, 利用现代转基因技术结合常规育种手段培育磷高效新品种是解决这一问题的有效途径。目前, 已有百余个磷营养效率候选基因被克隆, 但真正用于植物转基因育种实践的却寥寥无几, 且进展缓慢。究其原因可能是由于现有候选基因种类繁杂且未系统分类, 有些基因的功能尚未明确, 缺少克隆与育种交流平台等问题。鉴于此, 本文将目前已克隆的植物磷营养效率候选基因按照其功能不同进行分析, 对基因的生物学功能及其潜在应用价值进行归纳总结。这不仅为分子生物学家选择目标基因, 解析植物磷高效分子机制提供参考, 同时为育种学家进行基因转化, 培育磷高效新品种搭建平台。

关键词: 低磷胁迫; 候选基因; 转基因育种; 植物磷高效

Research Progress of Candidate Genes for Improving Plant Phosphorus-Efficiency

LI Xi-huan, CHANG Wen-suo, ZHANG Cai-ying

(North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Education Ministry of China/
Agriculture University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Low phosphorus (P) availability in soil and consequent P-deficiency represent the major constraint to plant production and quality improving in many countries. Selecting or developing new plant germplasm or varieties that are better adapted to low soil P conditions through the modern transgenic breeding approach may provide a new opportunity to improve the efficiency of phosphorus by plants. Recently, many molecular biology labs have identified hundreds of genes associated with plant phosphorus metabolic pathway. But only a few were used in plant transgenic breeding and the research progress were very laggardly. The reasons may be related to the unclear gene functions, different gene types and the collaboration problems between breeding and molecular biology researchers. In this review, we summarized the research progress of phosphorus metabolism related candidate genes in plant, and the gene types were also analyzed. More important in this paper is that the functions and latent values of all these genes related to phosphorus-metabolism were pointed out and concluded. So it is significant to offer some useful genes to plant transgenic breeding with high P-efficiency, and also very important to understand the molecular mechanisms of P-efficiency in plant.

Key words: Low phosphorus stress; Candidate genes; Transgenic breeding approach; Phosphorus efficiency

磷对于植物正常生长发育具有重要作用, 缺磷将导致植物出现明显营养失调症状, 且最终影响其产量提高与优良特性形成^[1]。植物所需磷素 90%

以上来自土壤, 然而由于磷肥极易被固定, 使得土壤中有效磷的含量很低, 一般只有 $2.0 \mu\text{mol/L}$, 远远不能满足植物正常生长发育所需^[2], 故只有通过施用

收稿日期: 2011-01-12 修回日期: 2011-10-29

基金项目: 国家转基因重大专项课题(2009ZX08004-004B); 国家自然科学基金项目(31071441); 河北省自然科学基金项目(C2010000749); 河北省教育厅科学研究项目

作者简介: 李喜焕, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: lixihuan@hebau.edu.cn

通讯作者: 张彩英, 博士, 研究员, 从事大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn

磷肥,植物才能获得或维持较高产量。据统计,我国每年约施用1100万t纯磷,占世界总用量30%左右,但磷肥当季利用率却仅有10%~15%,相当于每年约有1000万t纯磷积累于土壤,形成植物不能直接吸收利用的非有效态^[3]。同时,过量施磷及磷肥中重金属元素积累,已成为水资源与土壤的长期污染源;且磷矿不可再生,全球磷矿趋于耗尽^[4]。我国磷矿资源(尤其高品位磷矿)严重匮乏,优质磷肥依赖进口,造成农业生产成本提高,农民负担加重。综上,土壤缺磷已成为当前农业持续发展重要限制因子,成为诸多育种学家和营养学家关注的重点问题;如何提高土壤磷的生物有效性,提高植物对土壤有机态磷的吸收利用效率将是解决磷资源危机的关键所在。

提高植物自身利用土壤有机态磷的能力,利用现代生物技术结合常规育种手段选育对土壤非有效态磷利用能力明显增强的作物新品种,是解决农作物需磷与土壤供磷矛盾、改善植物磷素营养状况的有效途径^[5]。这不仅可以维持农业生态系统的良性循环,而且对于我国农业可持续性发展亦具有深远意义。目前,植物磷高效转基因育种工作尚处于起步阶段,且进展缓慢。尽管已有百余个磷营养效率候选基因相继被克隆,但真正用于农作物转基因育种实践的却数量有限,绝大部分候选基因尚处于搁置状态,未能被转基因育种所利用。造成这种现状的原因可能有以下几个:(1)现有磷效率基因种类繁杂,未能进行系统分析,育种学家难以有针对性地进行选择;(2)候选基因对提高植物磷效率的贡献不一,有些基因尚需进一步研究,育种学家很难选择出功能明确且贡献率高的转化基因;(3)已有磷高效基因作用机理不同,对其磷高效分子机制研究远远不够;(4)分子生物学家与育种学家没有良好的交流平台,基因功能研究只是停留在几种模式植物上,不能更好地联系育种实践。

针对上述问题,充分了解目前已有磷营养效率相关基因的数量、种类、特点和功能,明确各类候选基因的作用机理,筛选出可用于育种的磷高效功能基因,加快这些候选基因的转化应用进程,尽快培育出磷高效新品种成为解决当前植物磷营养问题的关键。因此,本文系统整理了目前已克隆的磷营养效率相关基因,按照基因所属类别进行分析,并对这些候选基因的生物功能及其潜在应用价值进行了归纳和总结。这不仅为分子生物学家选择目标基因,进行植物磷营养高效分子机制解析研究提供参考,同时为育种学家选择转化基因培育磷高效作物新品种搭建了平台。

1 磷转运蛋白基因及其生物学功能

1.1 磷转运蛋白及其分类

土壤根际磷的有效性及其根系获取有效磷的能力是影响植物磷效率关键因子。由于土壤有效磷含量低,植物自身已形成一系列适应机制以便从土壤“磷库”中吸收更多磷素,如改变根形态结构、根系分泌酸性磷酸酶和有机酸等;但所富集的磷素最终还需通过根系高效吸收和转运系统“磷转运蛋白”来实现^[6]。实际上,植物对磷素吸收是一个由磷酸盐转运蛋白介导的跨质膜转运过程。在植物中,磷转运蛋白按照序列相似性可划分为 H^+/Pi 共转运家族(Ph1家族)和 Na^+/Pi 共转运家族(Ph2家族)两类;按照酶吸收动力学标准可分为低亲和力、高亲和力磷转运蛋白两类。据研究,低亲和力磷转运蛋白一般在外界磷浓度较高时起作用,呈组成型表达,是植物在正常生长状态下吸收磷的主要转运系统;而高亲和力磷转运蛋白则主要在外界磷浓度较低时发挥作用,是低磷胁迫下植物吸收磷的主要转运系统,呈低磷诱导型表达,一般在正常供磷情况下被抑制^[7]。可见,在2个转运系统中,以高亲和力磷转运蛋白与植物磷营养效率关系更密切。

1.2 磷转运蛋白基因及其功能

AtPT1、*AtPT2*是最早从拟南芥根系磷胁迫诱导cDNA文库中筛选的2个高亲和力磷转运蛋白基因^[8-9],低磷胁迫可诱导其在根中表达;*PHT1*、*PHT2*、*PHT3*是从拟南芥中分离到的另一类高亲和力磷转运子基因,将*PHT1*转入烟草悬浮细胞,基因能够高效表达,且转基因细胞的磷吸收效率显著提高。目前,已从水稻、拟南芥、烟草、番茄、苜蓿、马铃薯、大麦、长春花等多种植物中克隆出不同家族的磷转运蛋白基因,且多数可以互补缺乏高亲和力磷转运机制的酵母突变体。明凤等^[10]克隆并研究水稻中的磷酸盐转运蛋白基因*OsPT6:1*,同源重组表明,该基因的表达可以提高毕氏酵母对磷素的吸收效率,同时可使高亲和力磷酸盐转运蛋白缺失的酵母突变体的磷素吸收功能得以恢复。郭强等^[11]对水稻中的磷转运蛋白基因*OsPT6*进行酵母突变体互补试验发现,与酵母PHO调控系统中的磷转运子PHO84相似,*OsPT6*能够与缺失磷转运功能的酵母突变体实现互补,在低磷条件下亦可促进酵母突变体对磷素的吸收。

另外,Seo等^[12]研究水稻磷转运蛋白基因*Os-PTI*发现,在低磷胁迫、正常磷处理下,不同生长时

期(分蘖、抽穗和成熟期)的超表达水稻均比野生型在根部积累更多的磷酸盐,与野生型相比,转基因水稻能够产生更多的分蘖。明凤等^[13]研究水稻中的磷转运蛋白 *OrLPT1* 发现,该基因具有增加植物在缺磷胁迫下根系吸收磷素能力的作用,与对照愈伤组织相比,转基因愈伤组织在低磷处理下具有更高的吸磷速率。Daram 等^[14]通过研究番茄中的磷转运蛋白 *LePT1* 发现,该基因在酵母突变体内的表达恢复了酵母在 20 $\mu\text{mol/L}$ 磷介质中的生长,由 *LePT1* 补充的酵母突变体中磷素吸收几乎高出未获补充突变体的 7 倍。常胜合等^[15]研究小麦中的磷转运蛋白基因 *TaPT8* 和 *TaPHT2-1* 酵母突变体互补分析表明,基因能够与磷吸收功能存在缺陷的突变体实现功能互补,在低磷条件下可以促进酵母突变体对磷素的吸收。

表 1 磷转运蛋白基因及其生物学功能

Table 1 The phosphate transporter genes for improving plant phosphorus-efficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
<i>AtPT1</i> <i>AtPT2</i>	拟南芥	低磷胁迫诱导基因在根系表达,酵母突变体 <i>Ns219</i> (缺失 <i>PHO84</i>) 导入 <i>AtPT1</i> 或 <i>AtPT2</i> , 在低磷条件下的磷转运速率比突变体对照高 2.5 倍。	[8]、[9]
<i>OsPT6:1</i>	水稻	基因可以提高毕氏酵母对磷素的吸收效率,可使高亲和力磷酸盐转运蛋白缺失酵母突变体的磷素吸收功能得以恢复。	[10]
<i>OsPT6</i>	水稻	<i>OsPT6</i> 能够与缺失磷转运功能的酵母突变体实现功能互补,并在低磷胁迫条件下促进酵母突变体对磷素的吸收。	[11]
<i>OsPT1</i>	水稻	不同磷环境(低磷、正常磷)和不同生长时期(分蘖、抽穗和成熟)超表达水稻比野生型根部积累更多磷酸盐,转基因水稻产生更多分蘖。	[12]
<i>OrLPT1</i>	水稻	基因具有提高植物在缺磷胁迫下根系吸磷的能力,转基因愈伤组织在低磷处理下具有比对照愈伤组织更高的吸磷速率。	[13]
<i>LePT1</i>	番茄	基因表达恢复了酵母突变体在 20 $\mu\text{mol/L}$ 磷介质中的生长,由 <i>LePT1</i> 补充的酵母突变体的磷吸收高出未获补充突变体 7 倍。	[14]
<i>TaPT8</i>	小麦	基因能够与磷吸收功能存在缺陷的酵母突变体实现功能互补,低磷条件下可促进突变体对磷的吸收。	[15]
<i>TaPHT2;1</i>	小麦	基因能够与磷吸收功能存在缺陷的酵母突变体实现功能互补,在低磷条件下有促进突变体吸收磷的作用。	[15]
<i>OsPT2</i>	水稻	低磷胁迫条件下, <i>RNAi</i> 转基因株系中的磷含量急剧减少,证明基因对于水稻从低磷环境中获取磷素必不可少。	[16]
<i>TaPT2</i>	小麦	基因与酵母磷转运子编码基因 <i>PHO84</i> 功能相似,具有增强酵母吸收磷素的作用。	[17]
<i>PHT1</i> <i>PHT2</i> , <i>PHT3</i>	拟南芥	<i>PHT1</i> 转入烟草悬浮细胞能够高效表达,转基因细胞的磷吸收效率提高。随介质中磷浓度提高,转基因细胞的磷吸收速率下降。	[18]、[19]
<i>StPT1</i> <i>StPT2</i>	马铃薯	基因的反义表达伴随明显的表型变化,顶端优势丧失、丛生及块茎过早形成,磷充足条件下,野生型和转基因植物几乎没有差异。	[20]
<i>LePT2</i>	番茄	主要在缺磷植株的根表皮细胞和根毛区表达。	[21]
<i>Phl1;3</i> <i>Phl1;4</i>	拟南芥	启动子表达分析发现,基因不仅负责植物根系从土壤溶液中吸收磷素,并且可以调节植物体内磷素向维管组织转运的过程。	[22]
<i>StPT3</i>	马铃薯	在菌根侵染的马铃薯中获得, Northern 杂交发现在未被菌根侵染的马铃薯中无基因表达, <i>StPT3</i> 是一个菌根诱导表达的磷转运蛋白基因。	[23]

2 磷营养相关转录因子基因及其生物学功能

2.1 转录因子及其调控作用

转录因子(Transcription factor, TF) 也称反式作

用上,目前已有多个植物来源的磷转运蛋白基因被克隆获得,并通过酵母异源系统得到了功能验证,表 1 中整理了不同植物来源的磷转运蛋白基因及其生物学功能,分子生物学家或育种家可从中选择相应基因,进行分子机制或磷高效育种的研究。然而,也有学者提出,由于酵母中的磷代谢调控系统非常复杂,需要多个调控因子的相互作用才能实现功能;因而来自植物的外源基因(诸如磷转运蛋白基因)并不总是能够在酵母体内产生功能,或者即使产生了一定功能,也可能会与基因在植物体内本身的功能相差很大。因此,笔者认为在克隆获得这些候选基因后,还需要通过转入植物体内,利用过量表达或 RNA 干涉技术,来分析基因在植物体内的生理功能及其潜在价值,以便为植物磷高效转基因育种提供功能明确的新基因。

用因子,是能够与靶基因启动子的顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白,可通过它们之间以及与其他相关蛋白之间的相互作用来激活或抑制位于其下游的某些特异基因的表达。转录因子在植物生长发育的各个阶段以及适应多种逆境胁迫过

程中均具有重要作用。典型的植物转录因子通常具有 DNA 结合区、转录调控区、寡聚化位点和核定位信号等 4 个功能区域,且根据 DNA 结合区特点不同,可将转录因子分为若干家族。转录因子在已有几种不同类型的磷营养相关基因中,由于可以调控(开启或关闭)位于其下游的一系列(多则上百个)磷代谢相关基因的表达,从而更大程度和范围地提高植物对磷素的吸收或利用效率,因而显得尤为突出和重要。

2.2 磷效率相关转录因子及其功能

目前,在植物磷效率研究中所克隆的转录因子多属于 MYB、bHLH 及 WRKY 类。Rubio 等^[24]克隆了拟南芥中的磷代谢相关转录因子基因 *AtPHR1*,该转录因子属于 MYB 类,分析发现与衣藻 CrPSR1 同源,而衣藻 CrPSR1 是在光合真核生物中报道的第一个参与磷营养代谢的调节因子,早被证实与磷代谢密切相关。进一步分析发现 *AtPHR1* 发生突变,可导致一系列磷代谢相关基因表达量降低,且转基因拟南芥耐低磷能力随之下降。Yi 等^[25]克隆了水稻磷营养相关 bHLH 类转录因子基因 *OsPTF1*,该基因在低磷条件下的增强表达可使水稻植株干物重和磷含量高出野生型 30% 以上, RNA 干涉植株则比野生型下降 20% ~ 30%,被认为是国际上第一个报道的可明确提高植物磷营养效率的转录因子基因。苗鸿鹰等^[26]利用小麦根系低磷诱导 SSH 文库,克隆了

WRKY 类转录因子基因 *TaWRKY72b-1*,功能分析发现超表达转基因烟草在低磷胁迫下的磷吸收状况明显改善,植株体内低磷胁迫程度得以缓解,植株在低磷条件下的生长状况明显优于对照。

同时, Oswaldo 等^[27]从菜豆中分离得到了与 *At-PHR1* 高度同源的 *PvPHR1* 基因, RNAi 表明该基因编码蛋白是一个参与植物磷素运输、再利用的正向调控因子。Zhou 等^[28]通过同源基因克隆技术分离得到水稻基因 *OsPHR1* 和 *OsPHR2*,进一步分析发现这 2 个基因均与磷胁迫信号途径有关,且 *OsPHR2* 过量表达可使转基因水稻地上部的磷素含量明显增加。Devaiah 等^[29]分离获得了拟南芥中的转录因子基因 *ZAT6*,该转录因子属于锌指蛋白类型,过量表达 *ZAT6* 进行功能分析发现 *ZAT6* 是一个拟南芥主根生长抑制因子,可通过调控根系结构来调节植物体内的磷素平衡状态。除上述研究外,笔者所在课题组^[30-31]利用筛选获得的大豆磷高效资源为材料,克隆获得了磷效率相关转录因子基因 *GmPTF1* 与 *GmPHR1* (GenBank FJ617239, HQ007311),超表达转基因拟南芥耐低磷试验表明,这 2 个转录因子基因具有提高拟南芥在低磷条件下的耐低磷能力的作用。表 2 中列举了目前已报道的植物磷营养效率相关转录因子基因及其生物学功能,所有这些转录因子均可作为磷高效转基因育种及分子机制解析提供基因资源。

表 2 已报道的植物磷效率相关转录因子基因及其生物学功能

Table 2 The functions of transcription factor genes for improving plant phosphorus-efficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
<i>AtPHR1</i>	拟南芥	<i>AtPHR1</i> 发生突变导致一系列磷代谢相关基因表达量降低,转基因拟南芥耐低磷能力随之下降。	[24]
<i>OsPTF1</i>	水稻	低磷条件下,超表达转基因水稻植株干物重和磷含量高出野生型 30%,RNA 干涉植株比野生型低 20% ~ 30%。	[25]
<i>TaWRKY72b-1</i>	小麦	超表达转基因烟草可改善低磷胁迫下的磷素吸收、缓解体内低磷胁迫程度,改善生长状况。	[26]
<i>PvPHR1</i>	菜豆	RNAi 技术表明,该基因编码蛋白是一个参与植物磷素运输、再利用的正向调控因子。	[27]
<i>OsPHR1</i> , <i>OsPHR2</i>	水稻	与磷胁迫信号途径有关,可调控磷信号报告基因的表达,但转基因材料无明显表型变化。 与磷胁迫信号途径有关,且基因过量表达可使转基因水稻地上部的磷素明显增加和积累。	[28]
<i>ZAT6</i>	拟南芥	分析 <i>ZAT6</i> 过量表达转基因株系发现 <i>ZAT6</i> 是主根生长抑制因子,可通过调控根系结构调节植物体内的磷素平衡状态。	[29]
<i>GmPHR1</i>	大豆	经超表达转基因拟南芥的耐低磷试验证明, <i>GmPHR1</i> 具有提高拟南芥在低磷条件下的耐低磷能力的作用。	[30]
<i>GmPTF1</i>	大豆	经超表达转基因拟南芥的耐低磷试验证明, <i>GmPTF1</i> 具有提高拟南芥耐低磷能力的作用。	[31]

续表

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
<i>ZmPTF1</i>	玉米	超表达植株在缺磷基质中表现较好适应性, 下部叶片死亡数、叶色、叶片花青素积累等方面均表现较好。	[32]
<i>Pho1</i>	拟南芥	基因控制根系吸收的磷向木质部运转及卸载, <i>Pho1</i> 突变植株与野生型具有相同的磷吸收能力, 野生型向地上部运转吸收的磷是突变型的 40 倍, 突变株叶片含磷量明显低于野生型。	[33]
<i>Pho2</i>	拟南芥	基因可调节磷素在地上部的积累, <i>Pho2</i> 缺失突变株的幼苗叶片内含磷量是野生型的 2 倍, 显示突变株磷的负反馈调节机能缺失。	[34]
<i>BHLH32</i>	拟南芥	转录因子 BHLH32 是低磷反应的负调控因子, 参与低磷条件下的生化及根的形态变化; 功能缺失突变体在正常条件下积累更多的花青素, IPS 基因表达量增加, 磷含量及根毛数目均多于野生型, 还可以与控制根毛发生的关键转录因子 TTG1 和 GL3 互作。	[35]
<i>WRKY75</i>	拟南芥	基因表达受低磷诱导非常显著, RNAi 转基因株系在低磷条件下积累更多花青素, IPS 基因受低磷诱导表达程度降低, 磷吸收受到影响; 正常磷浓度和低磷条件下 RNAi 转基因株系的侧根长度和数目均高于野生型, 根毛数目比野生型显著增加。	[36]

3 植酸酶与磷酸酶基因在提高植物磷效率方面的应用

3.1 植酸酶基因及其在提高植物磷效率方面的应用

土壤磷有 50% ~ 80% 以有机态形式存在, 植酸磷占一半以上; 且植酸磷大多不溶于水, 不能被植物直接吸收和利用^[37]。同时, 每年施入土壤的大部分磷肥还会由于吸附、沉降和转化等作用成为有机态形式而被固定在土壤中, 不能被当季植物利用。由此可见, 土壤中的总磷含量并不低, 只是植物可吸收利用的有效态磷含量很低, 即所谓的“遗传学缺磷”现象。土壤现已成为一个巨大的“潜在磷库”, 亟待开发和利用。因此, 如何充分利用土壤中的有机态磷(尤其是植酸磷), 减少外部磷肥的施入量就成为磷素营养研究中的重要课题, 对于提高磷肥利用效率、解决植物磷素短缺、缓解磷肥危机及减少环境污染等均具有重大意义。

土壤中的植酸磷不可被直接吸收利用, 但可经植酸酶水解后释放出无机磷进而被吸收利用, 因而植酸酶基因在分解利用土壤有机态磷方面具有较好应用。目前, 关于植酸酶基因的克隆及其功能研究开展较多, 并已有转基因作物通过安全性评价阶段。据统计, 已获得的转植酸酶基因植物种类大约有 20 种, 其中包括水稻、小麦、玉米、棉花、大豆、烟草、苜蓿、拟南芥、三叶草、芝麻、油菜、马铃薯、甘蔗等; 所转化的植酸酶基因物种来源也包括黑曲霉、枯草芽孢杆菌、烟曲霉、大肠杆菌、酵母菌、月形单胞菌、大

豆、苜蓿等^[38]。但早先的一些研究大多集中在如何提高植物子粒植酸酶活性、减少饲料中的植酸酶添加量、提高饲料中的植酸利用效率、改善单胃动物磷素营养等方面。直到本世纪初, 植酸酶基因才开始逐渐应用到分解利用土壤中的植酸态磷、减少外部磷肥施用量、提高植物磷素营养效率、改善植物磷素营养等领域。

3.1.1 微生物来源的植酸酶基因及其应用 目前, 用于植物磷营养高效研究的植酸酶基因可分为两大类, 即微生物来源及植物自身来源的植酸酶基因, 其中以微生物来源的(尤其是曲霉类) 植酸酶基因克隆与应用较多。2001 年, Richardson 等^[39]将黑曲霉中(菌系 NRRL3135) 的植酸酶基因 *phyA* 转入拟南芥中, 结果发现转基因植株(超表达且带有信号肽) 在仅含植酸磷的培养基上生长状态良好, 植株的磷素营养状况也明显优于野生型对照。由此可见, 微生物来源的植酸酶基因除可分解饲料中的植酸外, 还可用于分解培养基质中的植酸磷, 提高植物对基质中有机态磷的吸收利用。随后, 一系列关于植酸酶提高环境有机磷利用效率方面的研究陆续出现。韩胜芳等^[40]将黑曲霉植酸酶基因 *phyA* 转入三叶草中, 转基因植株生长在植酸盐为唯一磷源条件下, 植株含磷量、磷累积量、鲜重与干重等指标均较野生型对照明显增加, 说明三叶草植株利用有机态磷的能力得到较好改善。张琪等^[41]将黑曲霉中的 *phyA2* 转入玉米中, 结果发现在植酸作为唯一磷源条件下, 超表达转基因玉米植株中的植酸酶基因能够在根系组织表达, 并能够分泌到玉米根际周围, 以高效

利用基质中的植酸态磷。

除上述报道外,关于微生物来源植酸酶基因转化不同植物材料,用于分解基质中的植酸磷,提高有机态磷利用效率的研究报道还有很多。表3中列举了目前已报道的可用于提高植物磷营养效率的植酸酶基因种类及其生物学功能,研究者可从中选择功能已明确、具有较好应用前景的候选基因来进行各类农作物的转基因育种研究。但需要注意的是,也有一些研究认为,在不同基质中植酸酶基因对磷的利用效率不同,如孔凡利等^[42]利用枯草芽孢杆菌中的植酸酶基因 *168phyA* 为材料,转入烟草中发现,在无菌培养基试验条件下,所有转基因烟草对植酸磷

的吸收利用能力、植株生物量及总磷吸收量均显著高于野生型对照;然而在沙培和土培试验条件下,转基因烟草对植酸磷的吸收利用与野生型相比并未提高,植株生物量和总磷吸收量指标的差异也不显著。George 等^[43]研究也发现,在控制条件下(如无菌培养基条件),转植酸酶基因的超表达植株分解利用植酸的能力较高;然而在土壤条件下(涉及了多种土壤类型),转基因植株并未表现出较好的植酸磷利用能力。因而,笔者认为,应尽快开展植酸酶在土壤中发挥活性的条件研究,分析该酶在不同土壤类型中发挥功能的影响因素,以加快植酸酶基因在提高土壤有机态磷营养效率方面的应用。

表3 已报道植酸酶基因及其功能验证

Table 3 The candidate phytase genes for improving plant phosphorus-efficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
<i>phyA</i>	黑曲霉	植酸作为唯一磷源条件下,超表达拟南芥生长及磷素营养状况明显优于对照。	[39]
<i>phyA</i>	黑曲霉	植酸盐为唯一磷源条件下,转基因三叶草的含磷量、磷累积量、鲜重、干重均增加,植株利用有机态磷的能力明显改善。	[40]
<i>phyA2</i>	黑曲霉	植酸作为唯一磷源条件下,超表达玉米中的植酸酶基因在植株根组织表达,并能够分泌到根际周围高效利用植酸磷。	[41]
<i>168phyA</i>	枯草芽孢杆菌	无菌培养基中,转基因烟草生物量、磷吸收量显著高于野生型;沙培和土培条件下,与野生型相比,转基因烟草生物量和磷吸收量差异不显著。	[42]
<i>GmPhy</i>	大豆	基因编码蛋白与紫色酸性磷酸酶同源性较高,转基因大豆细胞的植酸酶活性明显提高;在大豆幼苗子叶中特异表达,分解子叶中的植酸。	[44]
<i>MtPHY1</i>	苜蓿	转基因拟南芥生长状况及有机态磷的吸收情况明显提高;有机态磷条件下,超表达三叶草利用有机态磷的能力明显改善。	[45]、[46]
<i>appA2</i>	大肠杆菌	T ₁ 代转基因水稻成熟种子与茎叶无机磷含量显著提高,转基因植株对土壤磷的利用率影响有待进一步研究。	[47]
<i>AphyA</i>	无花果曲霉	转基因大豆根系分泌植酸酶活性、无机磷含量均高于对照。	[48]
<i>Sphy1</i>	大豆	转基因烟草植酸酶活性明显提高,关于植株对有机态磷利用能力的研究有待进一步开展。	[49]
<i>appA</i>	大肠杆菌	转基因大豆种子中的植酸酶活性明显提高,种子植酸含量下降90%,无机磷含量明显上升。	[50]
<i>phyA</i>	黑曲霉	转基因大豆悬浮细胞中的植酸酶活性明显提高。	[51]
<i>PRSPhy1</i>	黑曲霉	基因能够正常表达并稳定遗传,转基因水稻种子及其后代叶片中的无机磷含量明显提高,最高净增量达57%。	[52]
<i>phyA II</i>	黑曲霉	转基因玉米植株中的植酸酶活性高于对照。	[53]
<i>phyA2</i>	黑曲霉	转基因玉米子粒中的植酸酶活性是对照50倍。	[54]
<i>fphyA</i>	烟曲霉	植酸盐为唯一磷源条件下,转基因烟草生长状况优于对照,生长45d转基因烟草地上部干重、根干重、总磷含量为对照的2.0、1.5、2.7倍。	[55]
<i>168phyA</i>	枯草芽孢杆菌	缺磷条件下,转基因烟草和拟南芥能够积累更多的地上部干重和磷含量;培养基植酸盐消耗情况表明磷营养提高与转化基因的表达有关。	[56]
植酸酶基因	枯草芽孢杆菌	与野生型相比,转基因烟草开花及结果数量增加,种子IP6/IP5降低,在磷饥饿条件下生长良好。	[57]

3.1.2 植物来源的植酸酶基因及其应用 与微生物来源植酸酶基因进展相比, 植物中的植酸酶基因克隆及功能研究开展较晚、应用范围也较小。Hege-man 等^[44]克隆了大豆中的植酸酶基因 *GmPhy*, 分析发现编码蛋白与紫色酸性磷酸酶的同源性较高, 而与微生物来源的植酸酶基因蛋白序列同源性较低; 且 *GmPhy* 能够在大豆幼苗子叶中特异表达, 故而可用于分解贮存在植株子叶中的植酸磷, 为幼苗后期正常生长提供磷源。Xiao 等^[45]克隆了耐低磷植物苜蓿中的植酸酶基因 *MtPHY1*, 分析发现超表达转基因拟南芥在植酸磷条件下的生长状况明显优于对照, 植株吸收有机态磷的情况也优于野生型, 说明异源表达 *MtPHY1* 可以促进拟南芥对培养介质中植酸态磷的吸收与利用。Ma 等^[46]将植酸酶基因 *Mt-PHY1* 转入模式植物白三叶草中, 超表达转基因植株的磷吸收量、生物产量均较野生型对照有所提高, 说明该基因具有改善白三叶草吸收利用有机态磷的作用。除此之外, 还有一些其他植物来源的植酸酶基因已被克隆, 关于这些基因的生物学功能及其能否在磷高效育种中应用的研究正在进行。

3.2 磷酸酶基因及其在提高植物磷效率方面的应用

3.2.1 磷酸酶的作用及其类别 植物根际磷酸酶对于土壤磷的生物有效性具有重要作用, 磷酸酶可以通过水解磷酸酯类物质来释放出磷酸及其盐类供植物吸收利用。据研究, 在 pH 值为 4~9 的土壤中均存在磷酸酶, 它对地球上磷的生物化学循环也起着重要作用。有学者认为根系分泌磷酸酶是植物对缺磷胁迫最早和最剧烈的反应之一, 因此磷酸酶活性高低甚至可以作为诊断植株磷素丰缺的指标, 也可作为耐低磷品种筛选的生化指标^[7]。在云杉上的研究表明, 根际土壤酸性磷酸酶的活性是非根际土壤的 2.0~2.5 倍; 油菜在栽培 35 d 后, 其根际土壤中的磷酸酶活性可达到非根际土壤的 10 倍; 番茄幼苗在缺磷胁迫下的酸性磷酸酶分泌量是正常条件下的 6 倍^[5]。因此, 改善植株向根际分泌大量有活性、能分解土壤有机态磷的磷酸酶, 使有机态磷分解为易于被利用的有效态, 可能是增强植株抵御低磷胁迫逆境的有效途径。磷酸酶根据其催化活性所需环境酸碱度不同可分为酸性、中性和碱性 3 种, 并以酸性磷酸酶在植物磷营养效率研究中的应用较多

(表 4), 该酶一方面可促进植物体内有机态磷的重复利用, 另一方面也可促进根际土壤中有机态磷的矿化和分解。

3.2.2 磷酸酶基因及其生物学功能 肖凯等^[58]将蒺藜苜蓿中的紫色酸性磷酸酶基因 *MtPAP1* 转入拟南芥中发现, 在植酸盐为唯一磷源条件下, 超表达植株的生物学产量、无机磷和全磷含量均明显高于对照; Ma 等^[46]将 *MtPAP1* 转入白三叶草中, 在有机态磷条件下, 转基因植株的磷吸收量明显增加, 生物产量也较野生型有所提高, 植株利用有机态磷的能力得到明显改善。Wang 等^[59]将拟南芥紫色磷酸酶基因 *AtPAP15* 转入大豆, 在酸性土壤中生长的 3 个转基因株系产量性状均明显优于野生型, 单株荚数提高 35.9%、41.0%、59.0%, 单株粒数提高 46.0%、48.3%、66.7%。谷俊涛等^[60]将白羽扇豆中的酸性磷酸酶 *Apase* 转入白三叶草, 在植酸盐为唯一磷源条件下, 超表达植株的磷素累积量、鲜重和干重显著增加, 基因能够明显增强白三叶草吸收有机态磷的能力。Bozzo 等^[61]研究番茄中的酸性磷酸酶基因发现, 该酶在酸性条件下可水解胞外磷脂化合物释放出磷以供植物利用; Liang 等^[62]研究菜豆的酸性磷酸酶基因 *PvPAP3* 发现, 该酶可通过利用胞外 ATP 作为无机磷源使植物适应低磷状态。另外, 本课题组利用磷高效品种中黄 15 为材料, 克隆获得紫色酸性磷酸酶 *GmPAP4* (GenBank HQ162477), 经保守域分析发现与多个植物酸性磷酸酶序列同源, 推测可能与植物磷营养效率相关。

尽管国内外有很多学者已在不同植物上证实了酸性磷酸酶基因的有效性, 但也有一些学者认为, 酸性磷酸酶基因资源可能对于作物磷营养性状的遗传改良提供了一个方向, 但由于土壤中分解含磷有机物的微生物种类繁多, 因而对于该种途径是否能够用于提高植物磷营养效率遗传改良的实用性尚存在很大争论。并且有学者报道, 有些植物如菜豆和豇豆, 随介质中磷浓度的不断降低, 并未引起植株分泌酸性磷酸酶, 且酶的活性也并没有随外界磷浓度的降低而出现增高趋势, 表明该酶的诱导表达系统与低磷胁迫并不相关, 但可能与根际难溶磷的活化作用有关。因此, 有学者提出, 也许只有对于某些特定的土壤类型(如有机土)而言, 通过植物自身分泌胞外酸性磷酸酶的途径才能够应用到改善植物磷营养研究中。

表 4 酸性磷酸酶基因及其在磷营养效率中的作用

Table 4 The candidate Apase genes for improving plant phosphorus-efficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
<i>MtPAP1</i>	蒺藜苜蓿	植酸盐为唯一磷源条件下,超表达拟南芥植株生物学产量、无机磷和全磷含量均明显高于对照;有机态磷为磷源条件下,超表达转基因白三叶草植株利用有机磷的能力得到明显改善。	[58]、[45]
<i>AtPAP15</i>	拟南芥	超表达转基因大豆在酸性土壤条件下,3个转基因株系产量性状均明显优于野生型,单株荚数、单株粒数均明显提高。	[59]
<i>APase</i>	白羽扇豆	植酸盐为唯一磷源条件下,超表达白三叶草植株磷素累积量、鲜重和干重显著增加,基因具有增强白三叶草吸收有机态磷的作用。	[60]
<i>SAP1, SAP2</i>	番茄	基因在酸性条件下,水解胞外磷脂化合物释放出磷,供植物利用;碱性条件下参与胞外活性氧类物质发生,与植物防御病菌侵染有关。	[61]
<i>PvPAP3</i>	菜豆	磷饥饿菜豆根系中克隆,作用于特定底物 ATP,可能通过利用胞外 ATP 作为无机磷源来使植物适应低磷胁迫。	[62]
<i>AtPAP20-AtPAP22</i>	拟南芥	组成型表达,定位于细胞质,序列与大豆植酸酶同源,可能参与拟南芥中的植酸分解代谢过程。	[63]
<i>NtPAP4, NtPAP12, NtPAP19, NtPAP21</i>	烟草	与烟草原生质体的再生壁合成有关。	[64]
<i>AtPAP11, AtPAP12, AtPAP17</i>	拟南芥	受磷饥饿诱导表达,可能参与磷营养代谢活动。	[65]
<i>AtPAP10</i>	拟南芥	与烟草 <i>NtPAP12</i> 同源,可能与细胞初生壁的合成相关。	[66]
<i>AtPAP13</i>	拟南芥	与大豆植酸酶基因 <i>GmPhy</i> 同源,可能与植酸代谢有关。	[66]
<i>AtPAP17</i>	拟南芥	受磷胁迫及氧化物胁迫诱导,参与活性氧类物质代谢;在磷缺乏时表达增强,与磷的内部再转运功能有关。	[67]
<i>NtPAP</i>	烟草	具有植酸酶的活性,可分解植酸,其活性与植物利用土壤中的有机态磷有关。	[68]
<i>StPAP2, StPAP3</i>	马铃薯	基因表达受磷供应水平影响,在低磷根系和茎中表达量增加,在根轴中心和根尖位置表达量高,根毛中表达量低。	[69]
<i>AtPAP26</i>	拟南芥	缺磷拟南芥悬浮细胞和幼苗中的主要磷酸酶,对于拟南芥在缺磷条件下利用土壤中的非有效态磷具有一定意义。	[70]
<i>AtsAPase</i>	拟南芥	受磷缺乏诱导表达。	[71]
<i>LASAP2</i>	白羽扇豆	转基因烟草在植酸为唯一磷源培养基中生长,干物重和磷积累量均高于对照;在土培条件下的磷吸收量也高于对照。	[72]
<i>LePS2</i>	番茄	番茄中 <i>LePS2</i> 的转录受磷素缺乏快速诱导,不受其他营养元素缺乏诱导,且这种诱导可以被磷抑制。	[73]
<i>PAP</i>	水稻	水稻有 26 个 <i>PAP</i> 同源基因,21 个在根或叶中表达;10 个在缺磷和 <i>OsPHR2</i> 超表达时上调表达;启动子区有 1~2 个 <i>OsPHR2</i> 转录因子结合元件,酸性磷酸酶活性及分泌活性在缺磷条件下增加。	[74]

4 根系及其分泌物相关基因在磷营养研究中的应用

4.1 根系形态相关基因及其在植物磷营养研究中的应用

在低磷逆境中,植物根系最先感受胁迫信号,因此,植物对于低磷胁迫的适应性机制也应首先表现在根系上。一般来讲,具有纤细根且分枝多,根毛健

全的植物,由于其根系与土壤有更大的接触面积和容积,所以对土壤磷的吸收也有更大的潜力。许多植物在适应缺磷营养胁迫时可产生大量纤细根和侧根,以充分利用光合作用产物来增大根系吸收磷的表面积和能力。白羽扇豆在低磷条件下会形成一种排根,其吸磷量远远高于普通根系,这也是目前发现的适应低磷胁迫最为有力的证据;菠菜和洋葱在低磷胁迫下的初生根很相似,但其侧根长度相差很大,

可引起其吸磷量 4 ~ 20 倍的差异; 油菜的磷高效类型则具有较长根系、较大根体积、根表面积与根活性吸收面积的特点。

目前, 涉及植物根系形态及其分布相关基因的克隆与应用研究相对较少。Mikami 等^[75] 从莨苕须根上克隆了 *HR7* 基因, 该基因的过量表达可以促进莨苕的侧根形成和激增, 从而具有提高磷素吸收效率的潜力。Fukaki 等^[76] 采用拟南芥突变体技术, 从孤根型突变体中分离到了 *SLR/IAA14* 蛋白, 该蛋白位于细胞核内, 具有抑制 *BA-GUS* 基因表达(该基因受生长素诱导)、抑制拟南芥侧根萌发的功能。而对于缺磷条件下白羽扇豆排根形成基因的研究则发现, 该过程涉及了碳代谢、次生代谢、信号传导及磷摄取等众多基因^[77]。Guo 等^[78] 从低磷诱导 SSH 文库中筛选得到一个 β -扩张蛋白基因 *GmEXPB2*, 该基因在低磷诱导的大豆根系中高效表达, 且参与根尖的形态建成。超表达转基因拟南芥的根系细胞分裂与伸长明显增加, 从而使得转基因拟南芥的生长与磷素吸收也得到明显改善。

4.2 有机酸分泌相关基因及其在植物磷营养研究中的应用

4.2.1 根系有机酸分泌及其功能 有研究表明, 植物在低磷条件下可以通过调节体内有机酸代谢途径中的酶活性, 来提高根系有机酸分泌量; 随后通过有机酸对根际土壤的酸化作用, 增加难溶态磷的可溶性, 或通过与 Fe、Al、Ca 等形成螯合物, 结合离子交换和还原化作用, 增加难溶态磷的释放, 从而改善植物对土壤中难溶磷的吸收与利用^[5]。常见几种有机酸分泌类型包括小麦分泌苹果酸, 玉米分泌柠檬酸或草酸, 水稻分泌柠檬酸、苹果酸、乙酸和琥珀酸, 拟南芥、烟草、大豆、苜蓿等分泌柠檬酸, 油菜分泌柠檬酸和苹果酸, 木豆分泌番石榴酸和甲氧苄基石酸等。据 Hoffland 等^[79] 用¹⁴C 研究表明, 油菜在低磷条件下分泌草酸和柠檬酸的数量是正常供磷状况的 9 倍。因此, 有学者提出, 通过改变植物体内有机酸代谢途径中关键基因的表达量(如柠檬酸合成酶 *CS* 基因、苹果酸脱氢酶 *MDH* 基因等), 来增加体内有机酸类物质的含量及分泌量, 从而增强植物对根际土壤中有机态磷的吸收利用, 也可成为改善植物磷素营养、提高土壤磷素利用效率的另一途径。目前, 关于这方面的研究主要集中在柠檬酸代谢途径以及苹果酸代谢途径 2 个方面。

4.2.2 有机酸分泌相关基因及其作用 柠檬酸存在于三羧酸循环中, 对于植物体内的糖代谢、脂肪及

蛋白质代谢均具有重要生理作用。有研究表明, 通过增加植物体内的柠檬酸合成酶活性, 使柠檬酸积累量增加, 进而提高柠檬酸分泌量, 则可以促进植物对基质中难溶性磷的吸收^[80]。López-Bucio 等^[81] 将假单孢杆菌中的柠檬酸合成酶基因转入烟草中, 转基因植株在低磷土壤中能够较好的生长和结实, 而对照植株则由于缺磷条件限制生长, 在 6 个月后仍不能开花结实。Koyama 等^[82-83] 将胡萝卜中的线粒体柠檬酸合成酶基因 *DeCS* 转入拟南芥中, 转基因植株体内的磷素含量明显增高, 生物产量也明显增加; 同时又将拟南芥中的线粒体柠檬酸合成酶基因 *DeCS* 转入胡萝卜中, 结果发现, 超表达转基因胡萝卜细胞能够在含有磷酸铝(难溶性磷的一种) 的培养基上生长, 且细胞的磷素吸收速率显著提高。胡利华等^[84] 将柠檬酸合成酶基因转入水稻中, 研究发现转基因籼稻植株在低磷条件下的株高、分蘖数、子粒产量和生物学产量均有不同程度的提高。

另外, De la Fuente 等^[85] 将假单孢杆菌柠檬酸合成酶基因导入烟草和苜蓿中, 超表达转基因植株根系柠檬酸合成能力比对照提高 10 倍以上, 根系分泌柠檬酸量也比对照高出 4 倍以上, 且转基因烟草在低磷胁迫条件下的芽干重、果实干重和生物学产量均明显高于对照。Tesfaye 等^[86] 将苹果酸脱氢酶 (*neMDH*) 基因在苜蓿中进行过量表达发现, 转基因植株根尖苹果酸脱氢酶的活性比对照高出 1.6 倍, 根部苹果酸的合成量和分泌量分别为对照 4.2 倍和 7.1 倍, 并且其他有机酸(如柠檬酸、草酸、琥珀酸和乙酸等) 的分泌量也相应增加, 最终使得转基因植株对磷的吸收能力得到提高。表 5 中列举了目前报道的有机酸分泌相关基因及其在植物磷效率研究中的应用情况, 研究者可从中进行针对性的选择和利用。

然而, 也有学者提出了不同说法, Delhazie 等^[87] 报道认为, 在 De la Fuente 等^[85] 提供的转基因烟草和苜蓿以及重新转化的转基因烟草中, 柠檬酸合成酶活性的增高并没有增加柠檬酸的合成; 同时还发现^[88] 将烟草柠檬酸合成酶基因 *CS* 过量表达或将异柠檬酸脱氢酶基因抑制表达, 所获得的转基因烟草柠檬酸合成酶活性虽然提高了 5 倍多, 但体内柠檬酸含量及体外柠檬酸分泌量并未增加。Wang 等^[89] 也提出, 在大田试验条件下所分泌的有机酸与室内条件下的完全不同, 且土壤条件下的有机酸代谢过程非常复杂。在土壤条件下, 有机酸一旦被分

泌出来就会立即由于酸性土壤中的阴离子交换作用而被吸附,也会由于石灰性土壤的存在而被迅速降解,因而导致其生物有效性迅速下降。另外,土壤中的有机酸含量一般都较低,大约在 $1 \sim 50 \mu\text{m}$,而浓度为 10mmol/L 的有机酸提取物也仅能分解 $1.9 \mu\text{m}$ 柠檬酸或 $0.8 \mu\text{m}$ 草酸,远远不能满足植物对磷的

需求。因此,非常有必要开展有机酸和土壤环境互作关系的基础研究,了解其在土壤中发挥作用的机理,并研究其控制养分吸收利用的影响因素,为进一步利用该途径改善植物磷素营养提供依据。

表 5 有机酸分泌基因及其在植物磷效率研究中的应用

Table 5 The organic acid genes and their applications in research of plant phosphorus-efficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	功能分析 Gene functions	参考文献 References
柠檬酸合成酶基因	假单孢杆菌	转基因烟草在低磷土壤中生长繁殖,对照生长受限,6个月后不开花结实。	[81]
线粒体柠檬酸合成酶基因 <i>mtCS</i>	拟南芥	超表达胡萝卜细胞在磷酸铝培养基上,柠檬酸分泌量增加,磷素吸收速率显著提高,生长状态优于野生型。	[82]
线粒体柠檬酸合成酶基因 <i>DcCS</i>	胡萝卜	转基因植物的柠檬酸活性提高,根分泌量增加,低磷土壤中的转基因拟南芥体内磷素含量增高,生物产量增加。	[83]
柠檬酸合成酶基因	假单孢杆菌	获得转基因水稻,植株性状研究正在进行。	[84]
柠檬酸合成酶基因		转基因粳稻植株在低磷条件下的株高、分蘖数、子粒产量和生物学产量均有不同程度提高。	[84]
柠檬酸合成酶基因 (<i>CSb</i>)	假单孢杆菌	超表达烟草和苜蓿根系柠檬酸合成能力比对照提高 10 倍,根系分泌柠檬酸比对照高出 4 倍,转基因烟草在磷胁迫情况下,植株芽干重、果实干重和生物学产量等明显高于对照。	[85]
苹果酸脱氢酶基因 <i>neMDA</i>		过量表达使叶片有机酸提高,根分泌有机酸增加,在含铝的酸性土壤中,转基因苜蓿有较好的根部生长速率和积累较多生物量,表明转基因植物能抗铝毒并对磷有较好吸收。	[86]
柠檬酸合成酶基因	苜蓿	完成烟草转化,功能研究正在进行。	[90]
线粒体柠檬酸合成酶基因 <i>DcCS</i>		转基因拟南芥分泌柠檬酸量比对照提高 3 倍,磷吸收能力也提高,改善了拟南芥在缺磷土壤上的生长。	[91]
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPC) 基因	白羽扇豆	PEPC 酶是合成柠檬酸途径中的一种限速酶,该基因在白羽扇豆排根的皮肤细胞中表达,并在低磷条件下增强表达。	[92]
NAD-ICDH 酶基因		反义表达转基因马铃薯植株柠檬酸异构酶活性降低,叶片柠檬酸含量增加,转基因植物具有较高的抗铝毒和对难溶性磷素营养的吸收能力。	[93]

5 核糖核酸酶基因及其生物学功能

核糖核酸酶 (RNase) 是一种可参与植物抗逆、抗病反应机制的水解酶,一般分为胞内 RNase 和胞外 RNase 两种。一方面,植物可以通过增强胞外 RNase 活性来利用生长介质中的无效态磷;另一方面,高等植物还可通过调节胞内 RNase 活性来降解衰老组织中的核糖核酸释放出磷,使其重新参与体内的磷素循环,并运送到植物幼嫩部位而被重新利用。因此,近年来关于核糖核酸酶基因的克隆及其

在提高植物磷营养效率中的应用研究也逐渐增加。很多研究发现,核糖核酸酶在植物衰老组织中的表达量要明显高于幼嫩组织和部位,这可能与 RNase 能够降解衰老组织中的核糖核酸以供体内磷素再利用的代谢途径有关。据报道,绿藻中的类核糖核酸酶基因 *VRN1* 在衰老细胞中的表达量可达到幼嫩细胞表达量的 3 倍。表 6 中总结了目前已报道的核糖核酸酶基因及其表达模式,这些基因可能在提高植物磷营养效率中有一定的潜在应用价值。

表 6 核糖核酸酶基因及其在低磷条件下的表达模式

Table 6 The candidate RNase genes and their expressions under phosphorus deficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	表达模式 Geneexpressions	参考文献 References
<i>WRN1</i>	小麦	与 S-核糖核酸酶和 S-like 核糖核酸酶的氨基酸序列同源, 受磷饥饿和衰老的负调控。	[94]
<i>WRN2</i>	小麦	与 S-核糖核酸酶和 S-like 核糖核酸酶的氨基酸序列同源, 受磷饥饿的正调控。	[94]
<i>WRN3</i>	小麦	与 S-核糖核酸酶和 S-like 核糖核酸酶的氨基酸序列同源, 受磷饥饿的正调控。	[94]
<i>RNase</i>	水稻	和正常营养条件下相比, 低磷胁迫水稻根部的 RNA 酶基因呈现上升表达趋势。	[95]
<i>RNS1</i> <i>RNS2</i> <i>RNS3</i>	拟南芥	<i>RNS1</i> 和 <i>RNS2</i> 受低磷诱导, <i>RNS3</i> 不受低磷诱导; <i>RNS1</i> 和 <i>RNS2</i> 的反义抑制使植株的花青素积累量增加。	[96]、[97]、 [98]
<i>RNase NE</i>	烟草	低磷条件下在根中诱导表达, Northern 分析显示基因在缺磷条件下诱导表达, 可能对烟草适应低磷胁迫有一定作用。	[99]
<i>RNase LX</i> <i>RNases LVI-3</i>	番茄	在番茄悬浮细胞中受低磷胁迫诱导, 细胞内缺磷时诱导表达, 加入磷素后抑制表达。	[100]
<i>Pdi370</i>	滑菇	在滑菇中受低磷诱导表达, 酶活检测表明低磷条件下的滑菇菌丝体和培养液中的酶活与正常条件相比提高 5 倍多。	[101]
<i>RNase LE</i>	番茄	在低磷处理 3h 后开始表达, 随后在 24h 内呈现上升趋势。	[102]

大量研究表明, 磷素缺乏可以诱导植物细胞外分泌型 RNase 和细胞内 RNase 的表达。烟草中的 *RNase NE* 是第一个被鉴定的植物核糖核酸酶基因, 该基因在烟草根系中受磷素饥饿诱导表达; 番茄 *RNase NE*、类 S-*RNase LE* 在低磷胁迫条件下也表现出相似的诱导表达趋势, 因而可能在满足番茄植株对磷素需求方面发挥着重要作用。常胜合等^[94] 分离获得了小麦中的核糖核酸酶基因 *WRN1*、*WRN2*、*WRN3*, 研究发现 *WRN1* 受磷饥饿和衰老的负调控, *WRN2*、*WRN3* 受磷饥饿的正调控。李利华等^[95] 对低磷胁迫下的水稻根系基因表达谱进行研究, 和正常营养条件相比, 低磷胁迫下的水稻根系 RNA 酶基因呈现上升表达趋势。Bariola 等^[96-97] 和 Taylor 等^[98] 对拟南芥中的核糖核酸酶基因 *RNS1*、*RNS2*、*RNS3* 进行研究, 在低磷条件下, *RNS1* 与 *RNS2* 的表达量均比对照明显增加, 且受低磷胁迫诱导表达; 转化 *RNS1*、*RNS2* 反义载体后发现, 转基因植株中的 *RNS1*、*RNS2* 转录水平分别降低 90%、65%, 且植株表现出花青素积累等缺磷症状。

6 其他类型的植物磷效率基因及其功能

6.1 植物质膜 ATPase 基因及其表达

ATPase 是一类能够水解 ATP 产生能量, 使各种离子逆向电化学势梯度进行跨膜运输的膜载体蛋白。植物细胞质膜和液泡膜上的 H^+ -ATPase 可以通过所建立的跨膜质子电化学势梯度, 推动各种离子和小分子代谢产物进行跨膜运输^[103]。有报道认为, 质膜 H^+ -ATPase 参与了植物对多种逆境胁迫的

适应, 诸如耐盐、耐铝毒、低 pH 值、铁胁迫等, 其中也包括植物对磷素缺乏的逆境反应过程。Shen 等^[104] 研究认为, 根系质膜 H^+ -ATPase 参与了大豆对低磷胁迫的适应性反应, 低磷条件下的大豆磷素吸收量可能会受到根系质膜 H^+ -ATPase 活性的调节, 且 IAA 参与了低磷条件下大豆根系激活质膜 H^+ -ATPase 的信号传导过程。

张洁等^[105] 采用半定量 RT-PCR 技术检测大豆根系质膜 H^+ -ATPase 基因在低磷胁迫下的表达情况, 发现该基因在低磷胁迫 2h 表达量开始增加, 4h 表达量达到最大, 6h 略有下降, 从而推断其可能与大豆适应低磷胁迫逆境条件有关。夏铭等^[106] 研究水稻液泡 ATPase B 亚基因发现, 该基因在水稻根系中受低磷诱导表达, 在植株根系磷饥饿 6~12h 时出现表达高峰, 而在叶片中的表达高峰则有所滞后 (24~48h)。Muchhal 等^[107] 研究番茄 Ca^{2+} -ATPase 基因发现, 在根系磷饥饿 24h 开始诱导表达, 且随磷饥饿持续进行, 基因的转录水平不断升高, 到 7d 后达到最高峰, 其总量大约增加了 5~10 倍 (表 7)。

6.2 植物 IPS 基因及其表达

IPS (Induced by Pi Starvation) 是植物对缺磷反应非常敏感和特异的一类非编码蛋白基因。目前, 苜蓿、拟南芥、水稻等作物中 IPS 基因家族已被克隆。对这些基因的研究表明, 只有在缺磷情况下, IPS 基因才表达, 而其他营养元素缺乏 (如缺氮、缺钾等) 以及干旱、低温和盐胁迫条件均不能诱导其表达, 故被认为是理想的可用于诊断植物是否缺磷的标记基因。因此, 了解这类基因的克隆及其在低磷条件下的表达情况, 对于解析植物磷高效利用分

表 7 其他类型的植物磷效率基因及其表达

Table 7 The other related genes and their expressions under phosphorus deficiency

基因名称 Gene name	物种来源 Plant species	表达分析 Gene expressions	参考文献 References
根系质膜 $H^+ -ATPase$ 基因	大豆	低磷胁迫 2h, 基因表达量开始增加, 4h 时表达量最大, 6h 时略有下降。	[105]
液泡 ATPase B 亚基基因	水稻	基因在水稻根系中受磷饥饿诱导表达, 磷饥饿 6 ~ 12h 出现表达高峰, 在叶片中表达高峰有所滞后 (24 ~ 48h)。	[106]
$Ca^{2+} -ATPase$	番茄	基因在番茄根系磷饥饿 24h 开始表达, 随磷饥饿持续进行, 转录水平继续升高, 7 d 后达到最高峰, 约增加 5 ~ 10 倍。	[107]
<i>TPSII</i>	番茄	在磷饥饿状态下的叶片和根系中迅速表达, 重新供给充足的磷营养时, 基因的转录水平迅速减弱。	[108]
<i>Mt4</i>	拟南芥	在未受 VAM 侵染且处于磷饥饿的根系中表达, 但自侵染早期开始, 表达量显著减弱, 且受环境中的高磷抑制。	[109]、[110]
<i>At4</i>	拟南芥	低磷条件下, 基因突变体的根吸收磷的速度下降, 而向地上部运输的速度相对增加, 导致根中的无机磷含量降低。	[111]
<i>TaIPS1.1</i> , <i>TaIPS1.2</i> , <i>TaIPS1.3</i> , <i>TaIPS2.1</i> , <i>TaIPS2.2</i>	小麦	缺磷处理 8 d 后, 根系 <i>TaIPS1.1</i> 、 <i>TaIPS1.2</i> 、 <i>TaIPS1.3</i> 、地上部 <i>TaIPS1.1</i> 显著增加; 根系 <i>TaIPS2.1</i> 、 <i>TaIPS2.2</i> 中度上调; 地上部 <i>TaIPS1.2</i> 、 <i>TaIPS2.1</i> 、 <i>TaIPS2.2</i> 轻度上调。	[112]
<i>OsIPS1</i> <i>OsIPS2</i>	水稻	磷胁迫开始时, 低丰度诱导表达, 持续胁迫后, 高丰度诱导表达; 无磷条件下, <i>OsIPS1</i> 主要在初生根的中柱和侧根中表达, 地上部表达极弱; <i>OsIPS2</i> 根部表达模式与 <i>OsIPS1</i> 一致, 地上部表达高于 <i>OsIPS1</i> 。	[113]
<i>GmEXPB2</i>	大豆	缺磷处理使基因在根系和下胚轴中的表达量增加; 缺磷条件下, 基因通过参与植株根毛的伸长过程, 从而影响植株的生长和磷吸收量。	[114]
<i>miR399</i>	拟南芥	受低磷胁迫诱导, 超表达株系在高磷条件下培养, 叶片磷含量高出野生型 5 倍, 叶片边缘失绿, 表现磷中毒症状; 根中的磷含量与野生型无明显差异, 但根的磷吸收能力比野生型增强。	[115]

子机理、实现植物磷营养状况分子诊断亦具有重要意义。

TPSII / *Mt4* 基因家族是目前研究较多的一类植物 IPS 基因, 被认为是一个新的磷缺乏诱导基因家族, 由于该家族在磷缺乏条件早期上升调控, 故可能在植物对低磷适应的早期阶段具有重要作用。*TPSII* 是 Liu 等^[108] 从番茄根系中克隆的磷饥饿诱导表达基因, 它只在磷饥饿状态下的叶片和根系中迅速表达, 重新供给充足的磷营养时, *TPSII* 的转录迅速减弱, 该基因可能是番茄磷饥饿的早期反应之一。Burleigh 等^[109-110] 从差异显示的首蓿与 VAM 互作过程中分离到一个差异表达的 cDNA 克隆 *Mt4*, 它与番茄根系中磷饥饿诱导表达的 *TPSII* 类似, 都具有多个转录起始位点, 可以编码多个较短的多肽, 而且 *TPSII* 和 *Mt4* 的启动子区域都有与酵母 PHO-regulon 相似的顺式作用元件。

Shin 等^[111] 分析拟南芥中的 *TPSII* / *Mt4* 同源基因 *At4*, 低磷条件下, *At4* 突变体的根吸收磷的速度下降, 而向地上部分运输的速度相对增加, 结果导致根中的无机磷含量降低。李彦龙等^[112] 认为小麦缺磷处理 8 d 后, 根系 *TaIPS1.1*、*TaIPS1.2*、*TaIPS1.3*、地上部 *TaIPS1.1* 表达量显著增加; 根系 *TaIPS2.1*、*TaIPS2.2* 表达量中度上调; 地上部 *TaIPS1.2*、

TaIPS2.1、*TaIPS2.2* 则轻度上调。侯兴亮^[113] 研究水稻中的 *OsIPS1*、*OsIPS2* 发现, 在低磷胁迫开始时, 基因能够低丰度诱导表达, 随着胁迫时间的延长, 基因出现高丰度诱导表达; 并且在无磷条件下, *OsIPS1* 主要在初生根的中柱和侧根中表达, 地上部表达极弱; 而 *OsIPS2* 的根部表达模式与 *OsIPS1* 一致, 但地上部表达高于 *OsIPS1*。表 7 中总结了已有的其他类型植物磷效率基因及其表达模式, 相信随着这些基因生物学功能研究的开展, 必将为进一步改善植物磷素营养提供依据。

7 结论

在漫长的生物进化过程中, 野生物种需要适应各种逆境条件而生存繁衍, 保留了许多优良性状, 如耐旱、耐盐碱、耐瘠薄、抗病等, 其中耐低磷营养胁迫也是其中之一。因此, 野生物种的基因组中常含有耐低磷胁迫的有益基因, 这为栽培物种的遗传改良提供了基因资源。早在 1987 年, Schettini 等^[116] 利用磷高效野生蚕豆 P1206002 与栽培种 Sanilac 杂交、回交, 获得了磷高效回交系; 与 Sanilac 相比, 回交系在低磷土壤中的茎叶干重提高 30% ~ 50%, 经济产量也明显增加, 表明野生资源中的磷高效基因

已被转育到栽培蚕豆基因组中; 在水稻上利用近等基因系群体(磷高效品种 Kasalath 与低效品种 Nipponbare 构建而成) 也获得了一些新品系, 低磷条件下新品系的生物量与磷吸收量均明显高于亲本 Nipponbare^[43]。程凤娴等^[117] 培育了 4 个磷高效大豆新品种, 通过经济效益分析表明, 无论在低磷土壤还是在中、高磷土壤条件下, 利用磷高效品种的纯收入远远高于当地品种和国家区试对照品种。由此可见, 通过基因渐渗可以实现植物磷高效性状的遗传改良。

目前, 随着现代生物技术尤其是植物基因工程的不断发展, 采用现代转基因技术结合常规育种手段来实现磷高效基因的转育, 由于具有转育速度快、育种进程短、不受物种亲缘关系限制等优点, 因而越来越受到重视。然而, 要想实现转基因育种与常规育种的有效结合, 分离和发掘新的、有功能的磷效率相关基因无疑就成为开展上述研究的重要前提。到目前为止, 已经有百余个磷效率相关基因被克隆报道, 但其应用范围仍然有限, 关于植物磷营养高效的分子机制也尚未明确。本文从 7 个方面总结了已克隆的磷效率相关基因, 并针对这些候选基因的生物学功能及其潜在应用价值进行了归纳总结, 为尽快实现各种磷效率基因(尤其是功能明确的基因) 的遗传转化, 加快转育磷高效相关基因的进程, 尽早培育出对土壤有机态磷利用效率高、能够更好地适应土壤低磷条件的植物新品种提供了依据。

参考文献

- [1] 陆景陵. 植物营养学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 26
- [2] Yan X L, Wu P, Ling H Q, et al. Plant nutrionomics in China: An overview [J]. Ann Bot 2006 98: 473-482
- [3] 吴平. <http://www.cls.zju.edu.cn/wulab/poster>. PDF 2010
- [4] 严小龙, 张福锁. 植物营养遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 6-7
- [5] 乔亚科, 李桂兰. 作物耐低磷机制及耐低磷育种研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2007, 21(1): 67-73
- [6] 王萍, 陈爱群, 余玲, 等. 植物磷转运蛋白基因及其表达调控的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(4): 584-591
- [7] 戴开结, 何方, 官会林, 等. 植物与低磷环境研究进展——诱导、适应与对策[J]. 生态学杂志, 2006, 25(12): 1580-1585
- [8] Mulchhal U S, Pardo J M, Raghohama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci 1996 93: 10519-10523
- [9] Smith F W, Cybinski I D, Rae A L. Regulation of expression of genes encoding phosphate transporters in barley roots [M]//Gissel-Nielsen G, Jensen A. Plant Nutrition Molecular biology and Genetics. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1999: 145-150
- [10] 明凤, 路群, 王伟, 等. 水稻磷酸盐转运蛋白基因的克隆、表达及功能分析[J]. 中国科学(C 辑), 2006, 36(5): 385-389
- [11] 郭强, 孙淑斌, Yu L, 等. 水稻中的磷转运蛋白基因在异源表达系统中的功能分析[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(3): 227-233
- [12] Seo H M, Jung Y H, Song S Y, et al. Increased expression of Os-PT1, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice [J]. Biotech Lett 2008, 30: 1833-1838
- [13] 明凤, 路群, 戴薇, 等. 水稻高亲和磷酸盐转运蛋白功能的初步研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(3): 203-207
- [14] Daram P, Brunner S, Amrhein N, et al. Functional analysis and cell-specific expression of phosphate transporter from tomato [J]. Planta, 1998, 206: 225-233
- [15] 常胜合, 舒海燕, 董一平, 等. 两个小麦磷转运蛋白基因的分离、功能鉴定和表达研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1779-1785
- [16] Ai P H, Sun S B, Zhao J N, et al. Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation [J]. Plant J, 2009, 57: 798-809
- [17] 曾雅娟, 英加, 刘建中, 等. 小麦吸收土壤磷转运子在酵母突变体中的功能互补分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 1017-1020
- [18] Mitsukdwa N, Okumura S, Shibata D. High-affinity phosphate transporter genes of *Arabidopsis thaliana* [M]//Plant Nutrition For Sustainable Food Production and Environment. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1997: 187-190
- [19] Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, et al. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions [J]. Proc Natl Acad Sci 1997 94: 7098-7102
- [20] Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier J W. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast: identification of phosphate transporters from higher plants [J]. Plant Cell 1997 9: 381-392
- [21] Liu C M, Muchhal U S, Uthappa M, et al. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus [J]. Plant Physiol 1998, 117: 311-319
- [22] Mudge S R, Rae A L, Diatloff E, et al. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis* [J]. Plant J 2002 31: 341-353
- [23] Rausch C, Daram P, Brunner S, et al. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato [J]. Nature, 2001, 414: 462-466
- [24] Rubio V, Linhares F, Solano R, et al. A conserved myb transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. Gene Dev 2001, 15: 2122-2133
- [25] Yi K K, Wu Z C, Zhou J, et al. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Plant Physiol 2005, 138: 2087-2096
- [26] 苗鸿鹰, 赵金峰, 李小娟, 等. 转录因子基因 *TaWRKY72b-1* 的克隆、表达及在烟草中表达对植株磷效率的影响[J]. 作物学报, 2009, 35(11): 2029-2036
- [27] Oswaldo V L, Catalina A H, Mario R, et al. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots [J]. Plant Cell Environ 2008, 31: 834-843
- [28] Zhou J, Jiao F C, Wu Z C, et al. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants [J]. Plant Physiol 2008, 146: 1673-1686
- [29] Devaiah B N, Nagarajan V K, Raghohama K G. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* is synchronized by the Zinc Finger Transcription Factor ZAT6 [J]. Plant Physiol 2007, 145: 147-159
- [30] 王运杰. 大豆 MYB 转录因子 *GmPHR1* 的基因克隆与功能研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010: 24-38
- [31] 李喜焕. 大豆品种资源耐低磷鉴定及相关转录因子基因 *GmPTF1* 的克隆[D]. 保定: 河北农业大学, 2008: 63-76
- [32] 李朝霞, 高强, 刘雅正, 等. 玉米 *ZmPTF1* 基因克隆和过表达分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33: 92-96

- [33] Porrier Y, Thoma S, Somerville C, et al. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 1087-1093
- [34] Delhaize E, Randall P. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 207-213
- [35] Chen Z H, Nimmo G A, Jenkins G I, et al. BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis* [J]. *Biochem J*, 2007, 405: 191-198
- [36] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghobama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1789-1801
- [37] Lung S C, Lim B L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate [J]. *Plant Soil*, 2006, 279: 187-199
- [38] Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application [J]. *Food Technol Biotech*, 2006, 44 (2): 125-140
- [39] Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate [J]. *Plant J*, 2001, 25(6): 641-649
- [40] 韩胜芳, 谷俊涛, 肖凯. 高效表达黑曲霉 *PhyA* 基因改善白三叶草对有机态磷的利用[J]. *作物学报*, 2007, 33(2): 250-255
- [41] 张琪, 陈茹梅, 杨文竹, 等. 组成型表达植酸酶基因 (*phyA2*) 玉米的获得[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(4): 623-629
- [42] 孔凡利, 林文量, 严小龙, 等. 转枯草芽孢杆菌植酸酶基因烟草对不同介质中植酸磷的吸收利用[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(12): 2389-2393
- [43] George T S, Richardson A E. Potential and limitations to improving crops for enhanced phosphorus utilization [J]. *Plant Eco-physiol*, 2008, 7: 247-270
- [44] Hegeman C E, Grabau E A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1598-1608
- [45] Xiao K, Zhang J H, Harrison M, et al. Ectopic expression of a phytase gene from *Medicago truncatula* barrel medic enhances phosphorus absorption in plants [J]. *Integr Plant Biol*, 2006, 48(1): 35-43
- [46] Ma X F, Wright E, Ge Y X, et al. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes [J]. *Plant Sci*, 2009, 176: 479-488
- [47] 李进, 侯海军, 黄复深, 等. 基因枪介导获得植酸酶基因水稻研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(1): 6-12
- [48] Li G L, Yang S H, Li M G, et al. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 1297-1303
- [49] 郭丽. 大豆苗期磷代谢生理参数和大豆新型植酸酶基因 (*sphy1*) 克隆[D]. 保定: 河北农业大学, 2008: 21-27
- [50] Bilyeu K D, Zeng P Y, Coello P, et al. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 468-477
- [51] Li J, Hegeman C E, Hanlon R W, et al. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 1103-1111
- [52] 李钱峰, 刘巧泉, 张达江, 等. 转基因水稻中重组植酸酶的表达[J]. *中国水稻科学*, 2006, 20(3): 243-247
- [53] 刘欣芳, 高晓蓉, 苏乔, 等. 植酸酶基因玉米的获得及其后代的初步鉴定[J]. *玉米科学*, 2008, 16(1): 15-19
- [54] Chen R M, Xue G X, Chen P, et al. Tarczyński, Jinrui Shi. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene [J]. *Transgenic Res*, 2008, 17(4): 633-643
- [55] 王严. 曲霉植酸酶基因的克隆及其表达研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2007: 85-87
- [56] Lung S C, Chan W L, Yip W K, et al. Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization [J]. *Plant Sci*, 2005, 169: 341-349
- [57] Yip W, Wang L, Cheng C, et al. The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(4): 1148-1154
- [58] 肖凯, 谷俊涛, Maria H, 等. MtPAP1 表达特性及异源表达对拟南芥有机态磷吸收的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(1): 99-106
- [59] Wang X R, Wang Y X, Tian J, et al. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151: 233-240
- [60] 谷俊涛, 李金才, 韩胜芳, 等. 异源表达白羽扇豆酸性磷酸酶基因对白三叶草磷吸收的影响[J]. *草业学报*, 2007, 16(4): 69-75
- [61] Bozzo G G, Raghobama K G, Plaxton W C. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(24): 6278-6287
- [62] Liang C, Tian J, Lam H M, et al. Biochemical and molecular characterization of Pv-PAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 854-864
- [63] 李东屏, 王道文. 3 个拟南芥紫色酸性磷酸酶基因的 cDNA 克隆及体外表达[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2003, 26(3): 78-82
- [64] Kaida R, Sage-ono K, Kamada H, et al. Isolation and characterization of four cell wall purple acid phosphatase genes from tobacco cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625(2): 134-140
- [65] Li D P, Zhu H F, Liu K F, et al. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*: Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 27772-27778
- [66] Hegeman C E, Grabau E A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1598-1608
- [67] Delpozo J C, Allona I, Rubio V, et al. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing / oxidative stress conditions [J]. *Plant J*, 1999, 19(5): 579-589
- [68] Lung S C, Leung A, Kuang R, et al. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase [J]. *Phytochem*, 2008, 69(2): 365-373
- [69] Zimmermann P, Regierer B, Kossmann J, et al. Differential expression of three purple acid phosphatases from potato [J]. *Plant Biol*, 2004, 6(5): 519-528
- [70] Tran H T, Qian W Q, Hurley B A, et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 1-13
- [71] Haran S, Logendra S, Seskar M, et al. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(2): 615-626
- [72] Wasaki J, Maruyama H, Tanaka M, et al. Overexpression of the LASAP2 gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 2009, 55(1): 107-113
- [73] Baldwin J C, Karthikeyan A S, Raghobama K G. *LEPS2*, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 728-737
- [74] Zhang Q, Wang C, Tian J, et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling [J]. *Plant Biol*, 2011, 13: 7-15

- [75] Mikami Y ,Horiike G ,Kuroyanagi M , et al. Gene for a protein capable of enhancing lateral root formation [J]. FEBS Lett ,1999 , 451: 45-50
- [76] Fukaki H ,Tameda S ,Masuda H ,et al. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the solitary-root/IAA14 gene of *Arabidopsis* [J]. Plant J 2002 29: 153-168
- [77] Uhde-Stone C ,Zinn K E ,Ramirez-Yanez M ,et al. Nylon filter arrays reveal differential gene expression in Proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency [J]. Plant Physiol , 2003 131: 1064-1079
- [78] Guo W ,Zhao J ,Li X ,et al. A soybean β -expansin gene *GmEX-PB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses [J]. Plant J 2011 66 (3) : 541-552
- [79] Hoffland E. Quantitative evaluation of the role of organic and exudation in the mobilization of rock phosphate by rape [J]. Plant Soil ,1992 ,140: 279-289
- [80] 赵玥 陈丽梅 李昆志 等. 植物有效利用磷素营养有机酸代谢途径基因工程研究进展 [J]. 中国农学通报 2007 23(1) : 33-37
- [81] López-Bucio J ,De la Vega O M ,Guevara-García A ,et al. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that over produce citrate [J]. Nat Biotech 2000 ,18: 450-453
- [82] Koyama H ,Talita E ,Kawamura A ,et al. Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improve the growth of carrot cells in Al-phosphate medium [J]. Plant Cell Physiol ,1999 40: 482-488
- [83] Koyama H ,Kawamura A ,Kihara T ,et al. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil [J]. Plant Cell Physiol ,2000 41 (9) : 1030-1037
- [84] 胡利华 吴慧敏 周泽民 等. 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(CS) 导入籼稻品种明恢 86 [J]. 分子植物育种 , 2006 4(2) : 160-166
- [85] De la Fuente J M ,Ramirez-Rodriguez V ,Cabrera-Ponce J L ,et al. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis [J]. Science ,1997 276 (5318) : 1566-1568
- [86] Tesfaye M ,Temple S J ,Allan D L ,et al. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum [J]. Plant Physiol ,2001 , 127: 1836-1844
- [87] Delhaize E ,Hebb D M ,Ryan P R. Expression of a pseudomonas aeruginosa citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux [J]. Plant Physiol , 2001 125 (1) : 2059-2067
- [88] Delhaize E ,Ryan P R ,Hocking P J ,et al. Effects of altered citrate synthase and isocitrate dehydrogenase expression on internal citrate concentrations in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Plant Soil 2003 248: 137-144
- [89] Wang X R ,Yan X L ,Liao H. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach [J]. Ann Bot ,2010 , 106: 215-222
- [90] 靳苗苗 杨青川 金洪 等. 紫花苜蓿柠檬酸合成酶基因的克隆及对烟草的转化 [J]. 草地学报 2010 18(4) : 550-555
- [91] Ohno T ,Koyama H ,Hara T. Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion [J]. Plant Cell Physiol 2003 44(2) : 156-162
- [92] Neumann G ,Massonneau A ,Martinoia E ,et al. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin [J]. Planta ,1999 208: 373-382
- [93] Kruse A ,Fieuw S ,Heineke D ,et al. Antisense inhibition of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in transgenic potato plants [J]. Planta ,1998 205 : 82-91
- [94] Chang S H ,Shu H Y ,Tong Y P ,et al. Expressions of three wheat S-like RNase genes were differentially regulated by phosphate starvation [J]. 作物学报 2005 31(9) : 1115-1119
- [95] 李利华 邱旭华 李香花 等. 低磷胁迫水稻根部基因表达谱研究 [J]. 中国科学(C) 2009 39(6) : 549-558
- [96] Bariola P A ,Howard C J ,Taylor C B ,et al. The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation [J]. Plant J ,1994 6: 673-685
- [97] Bariola P A ,MacIntosh G C ,Green P J. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*: Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation [J]. Plant Physiol , 1999 ,119: 331-342
- [98] Taylor C B ,Bariola P A ,Del Cardayre S B ,et al. RNS2: A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation [J]. Proc Natl Acad Sci ,1993 90: 5118-5122
- [99] Dodds P N ,Clarke A E ,Newbigin E. Molecular characterization of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation [J]. Plant Mol Biol ,1996 31: 227-238
- [100] Löffler A ,Abel S ,Jost W G ,et al. Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells [J]. Plant Physiol ,1992 98: 1472-1478
- [101] Tasaki Y ,Azwan A ,Hara T ,et al. Structure and expression of a phosphate deficiency-inducible ribonuclease gene in *Pholiota nameko* [J]. Curr Genet 2004 45: 28-36
- [102] Kock M ,Löffler A ,Abel S ,et al. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato [J]. Plant Mol Biol ,1995 27: 477-485
- [103] 邓林 陈少良. ATPase 与植物抗盐性 [J]. 植物学通报 2005 , 22(S) : 11-21
- [104] Shen H ,Chen J ,Wang Z ,et al. Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation [J]. J Exp Bot 2006 57 (6) : 1353-1362
- [105] 张洁 张晓红 张振海 等. 半定量 RT-PCR 法检测低磷胁迫下大豆根质膜 H⁺-ATPase 基因的表达 [J]. 河北农业大学学报 2009 32(4) : 53-56 75
- [106] 夏铭 王小兵 李海波 等. 水稻液泡 ATPase B 亚基基因的克隆及其在低磷胁迫下的表达特征分析 [J]. 植物学报 , 2002 , 44(5) : 573-578
- [107] Muchhal U S ,Raghothama K G. Phosphate starvation induced changes in the expression of tomato Ca²⁺-ATPase [J]. Plant Physiol ,1995 ,108: 112
- [108] Liu C ,Muchhal U S ,Uthappa M ,et al. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus [J]. Plant Physiol ,1998 ,116 (1) : 91-99
- [109] Burleigh S H ,Harrison M J. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition [J]. Plant Mol Biol ,1997 34 (2) : 199-208
- [110] Burleigh S H ,Harrison M J. The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots [J]. Plant Physiol ,1999 ,119 (1) : 241-248
- [111] Shin H ,Shin H S ,Chen R ,et al. Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation [J]. Plant J 2006 45: 712-726
- [112] 李彦龙 童依平 李滨 等. 氮磷亏缺对小麦 TaIPs 基因表达的影响 [J]. 西北植物学报 2008 28(7) : 1303-1307
- [113] 侯兴亮. 水稻 OsIPS1 与 OsIPS2 基因磷饥饿信号及激素调控模式的比较研究 [D]. 杭州: 浙江大学 2004: 40-48
- [114] Guo W ,Zhao J ,Li X ,et al. A soybean β -expansin gene *GmEX-PB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. [J] Plant J 2011 66(3) : 541-552
- [115] 杨辉霞 童依平 王道文. 拟南芥低磷胁迫反应分子机理研究的最新进展 [J]. 植物学通报 2007 24(6) : 726-734
- [116] Schettini T M ,Gabelman W H ,Gerloff G C. Incorporation of phosphorus efficiency from exotic germplasm into agriculturally adapted germplasm of common bean(*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Plant Soil ,1987 99(1) : 175-184
- [117] 程凤娟 涂攀峰 严小龙 等. 酸性红壤中磷高效大豆新种质的磷营养特性 [J]. 植物营养与肥料学报 2010 ,16(1) : 71-81