

低磷条件下过表达 *OsPHF1* 基因对粳稻农艺性状的影响

胡张华¹ 刘秀艳² 王玉锋³ 彭瑜³ 史晓亮³ 滕胜^{3,*}

(¹ 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所 浙江省植物有害生物防控重点实验室-省部共建国际重点实验室培育中心, 杭州 310021; ² 杭州电子科技大学 材料与环境工程学院, 杭州 310018; ³ 中国科学院 上海植物生理生态研究所/分子植物卓越中心 光合作用与环境生物学实验室, 上海 200032; *通讯联系人, E-mail: steng@sibs.ac.cn)

Agronomic Traits of Marker-free Transgenic *japonica* Rice with Overexpression of *OsPHF1* Under Low Phosphorus Environment

HU Zhanghua¹, LIU Xiuyan², WANG Yufeng³, PENG Yu³, SHI Xiaoliang³, TENG Sheng^{3,*}

(¹ State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ² College of Material and Environmental Engineering, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China; ³ Laboratory of Photosynthesis and Environmental Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; *Corresponding author, E-mail: steng@sibs.ac.cn)

Abstract: 【Objective】PHF1 (phosphate transporter assistance factor) regulates specific phosphorous transporters after transcriptional regulation and affects the utilization efficiency of phosphate. The main purpose is to develop selective-marker-free *OsPHF1*-overexpressed *japonica* rice (Kongyu 131), and study the agronomic traits of transgenic rice at different low phosphorus concentrations. It contributes to the cultivation of transgenic rice varieties with high phosphorus utilization efficiency. **【Method】**Marker-free *OsPHF1*-overexpressed transgenic lines were obtained by using double T-DNA methods, *Agrobacterium*-mediated infection and subsequent screening. The field experiments for T₃ and T₄ generations of transgenic plants were carried out under low phosphorus concentration (75 or 112.5 kg /hm² calcium superphosphate) medium-to-low phosphorus concentrations (225 or 300 kg /hm² calcium superphosphate) and normal phosphorus concentration (450 kg /hm² calcium superphosphate). **【Result】**Three marker-free homozygous transgenic lines F18-18, F22-32 and F25-6 were obtained. The expression levels of *OsPHF1* in lines F22-32 and F25-6 were much higher than that of wild type. Field experiments showed that compared with the wild type, the tiller number of F22-32 and F25-6 (T₃ generation) were increased by 55% and 25%, respectively and the yield per plant of F22-32 and F25-6 were increased by 38%–34%, respectively under medium-to-low phosphorus environment (300 kg/hm² calcium superphosphate). The yield of F22-32 and F25-6 transgenic lines (T₄) increased by 30% to 35%, the biggest improvement under low phosphorus (112.5 kg /hm² calcium superphosphate). Meantime, the tiller number and yield of F22-32 and F25-6 (T₄) also showed obvious boost under medium-to-low phosphorus (225 kg /hm² calcium superphosphate) levels. **【Conclusion】**Marker-free *OsPHF1* transgenic lines were cultivated using double T-DNA method. Two generation of homozygous transgenic lines showed significantly increased tiller number and yield at medium-to-low phosphorus level (112.5, 225 or 300 kg /hm² calcium superphosphate).

Key words: *OsPHF1*; overexpression; marker-free transgenic rice; low phosphorus concentration; yield

摘 要: 【目的】磷酸盐转运体运输协助因子(PHF1)通过转录后调节特定磷转运蛋白,影响磷酸盐的利用效率。本研究通过培育过表达 *OsPHF1* 的无选择标记转基因粳稻空育 131, 研究在不同磷浓度环境中 *OsPHF1* 的过表达对粳稻空育 131 产量的影响,为培育可商品化的磷高效转基因水稻品种提供依据。**【方法】**利用双 T-DNA 方法构建 *OsPHF1* 的过表达载体,通过农杆菌侵染法和后续筛选获得了无选择标记的转基因空育 131 纯合株系,通过对 T₃ 和 T₄ 代转基因植株的田间试验,研究转基因品系在低磷浓度(75 或 112.5 kg/hm² 过磷酸钙)、中低磷浓度(225 或 300 kg/hm² 过磷酸钙)和正常磷浓度(450 kg/hm² 过磷酸钙)下的农艺性状。**【结果】**获得了 3 个无筛选标记的纯合 *OsPHF1* 过表达转基因空育 131 株系 F18-18、F22-32 和 F25-6。其中, F22-32 和 F25-6 的 *OsPHF1* 的表达量远高于野生型。大田试验显示, F22-32 和 F25-6 株系的 T₃ 代在中低磷(300 kg/hm² 过磷酸钙)环境中,分蘖数比对照分别增加了 55% 和 25%,增产幅度分别为 38% 和 34%; F22-32 和 F25-6 株系 T₄ 代在低磷条件下(112.5 kg/hm² 过磷酸钙)产量的增幅最大,增产了 30%~35%;在中低磷条件下(225 kg/hm² 过磷酸钙)分蘖数和产量也有

收稿日期: 2018-03-23; 修改稿收到日期: 2018-06-04。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0100700); 农业部转基因专项(2016ZX08009003-004, 2014ZX08001-005); 国家自然科学基金资助项目(31570269, 31570279)。

明显增加。【结论】双 T-DNA 法能用于培育过表达 *OsPHF1* 的无筛选标记转基因水稻。田间试验显示, 高表达 *OsPHF1* 的转基因株系在中低磷条件下(112.5、225 或 300 kg/hm² 过磷酸钙)分蘖数和产量稳定增加。

关键词: *OsPHF1*; 过表达; 无选择标记的转基因水稻; 低磷浓度; 产量

中图分类号: Q755; S143.2; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)06-0557-08

磷是植物体内核酸、磷脂和 ATP 的重要组成部分, 在能量转移、蛋白质活化和代谢过程调控等方面具有重要的作用^[1]。作为植物所需的最重要矿质营养元素之一的磷, 却极难从土壤中获取。尽管生态系统中磷含量丰富, 但由于可被植物同化吸收的磷的化学形式主要是无机磷-磷酸盐(Pi), 而土壤中磷酸盐分布极不均衡, 并且大多数磷酸盐都无法自由移动, 因而不利于根系的吸收^[2]。因此, 土壤有效磷的供应状况和植物对磷素营养的吸收能力便成为植物生长发育的主要决定因素之一。

植物对磷的吸收是一个由磷酸盐转运蛋白介导的跨质膜的转运过程。在大部分植物中, 磷吸收系统分为低亲和力系统(low-affinity phosphate transporter system)和高亲和力系统(high-affinity phosphate transporter system)两大类^[3]。高亲和力磷酸盐转运蛋白主要负责通过根表皮细胞质膜从根围吸收磷, 而低亲和力磷酸盐转运蛋白负责植物内磷元素的转运^[4]。

磷酸盐转运蛋白(Pht)按其结构分为三大家族: Pht1, Pht2 和 Pht3。已经克隆出来的植物磷转运蛋白绝大部分属于 Pht1、Pht2 两类。其中, 绝大部分归属于 H₂PO₄⁻/nH⁺共运体的 Pht1 家族都属于高亲和力磷转运蛋白基因, 即利用质膜上的氢离子浓度梯度来驱动植物对磷素的吸收, 这一家族的基因负责基本的磷吸收和体内转运过程^[5]。根据基因序列相似性和转录分析, 推断拟南芥和水稻整个基因组可能分别含有 9 个和 11 个 Pht1 家族的成员, 在从土壤中(包括水稻的菌根菌丝体)吸收磷以及植物体内磷的转运过程中起作用^[6, 7]。这些 Pht1 家族的磷酸盐转运蛋白主要存在于细胞质膜上^[8, 9]。

低磷对编码磷转运蛋白基因的激活可能是植物对磷吸收的重要调控机制, 磷素缺乏会使根部转运蛋白的丰度增加, 该类蛋白的表达水平和外界磷素供应显著负相关^[10]。此外, 转录后调控对于磷转运蛋白基因的表达也至关重要。其中之一就是磷酸盐转运体在通过分泌途径向质膜运输的过程中的调控作用。多项研究表明, 生物中蛋白分泌迁移的第一个也是最重要的步骤便是蛋白由内质网输出到高尔基体的过程, 这一关键步骤是由 COP II 囊泡调节的^[11]。COP II 的形成是由 SAR1 GTPase 启动的,

SAR1 GTPase 经 SEC12 鸟苷酸置换因子活化后, 可推动 COP II 囊泡包被的形成以及输出底物的选择^[12]。研究发现, 拟南芥中编码的磷酸盐转运体运输协助因子(PHF1)是一个植物特有的与 SEC12 类似的蛋白, 编码该蛋白的基因突变后显著降低了植株对磷酸盐的吸收。该基因受缺磷诱导, 且参与调控拟南芥中的磷酸盐转运体 AtPht1;1 从内质网到膜的运输过程^[13]。

浙江大学植物生理学和生物化学国家重点实验室利用图位克隆方法从抗砷突变体库中克隆到了一个和磷吸收相关的基因, 其所编码的具有 WD40 结构域的蛋白与拟南芥中 AtPHF1 同源, 因此将这个基因命名为 *OsPHF1*。*osphf1* 突变体表现出对砷的抗性, 实验证明向突变体中转入 *OsPHF1* 基因的过表达载体可以恢复突变体叶片有效磷浓度降低的表型, 过量表达 *OsPHF1* 导致植物在供 Pi 水培的条件下地上和地下部 Pi 的积累量增加。*OsPHF1* 定位于内质网, *osphf1* 突变体中低亲和 Pi 转运蛋白 OsPT2 和高亲和 Pi 转运蛋白 OsPT8 滞留在内质网, 影响了磷转运蛋白 PT2 和 PT8 的膜定位^[14]。在低磷环境中, *OsPHF1* 在籼稻 9311 中的过表达可促进作物的生长, 增加产量。*OsPT2*、*OsPT8*、*OsPT10* 在 *OsPHF1* 过表达水稻的根中上调表达, 证明该基因的过表达能显著提高水稻有效磷吸收和转运功能^[15]。

空育 131 以空育 110(道黄金)为母本, 道北 36(北明)为父本杂交育成。1990 年由黑龙江省农垦科学院水稻研究所从日本引进并选育而成, 现在是我国北方广泛应用的高产粳稻品种。本研究通过培育无选择标记的 *OsPHF1* 过表达粳稻空育 131 转基因材料, 通过一系列的分子实验和大田实验, 研究在粳稻背景下 *OsPHF1* 过表达在低磷环境中的生物学功能, 为水稻分子育种的实践提供借鉴和帮助。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株

粳稻空育 131(野生型)、*OsPHF1* 过表达转基因株系的 T₁ 和 T₂ 植株均种植于中国科学院上海植物生理生态所人工气候室中, T₃ 和 T₄ 转基因株系种

植于中国科学院上海植物生理生态所栽培与育种基地(简称上海基地)和浙江大学海南繁殖与育种基地(简称海南省三亚基地)。

所用菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 Trans1-T1 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101, 均由本实验室保存。

1.2 *OsPHF1* 的克隆和过表达载体的构建

根据水稻 *OsPHF1* 的 cDNA 序列(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>, 登录号为 LOC_Os01g50820, 由日本晴中克隆得到), 设计引物包含 *OsPHF1* 完整的阅读框, 并在上游和下游引物上分别引入限制性内切酶位点 *Xba* I 和 *Sal* I 的引物对: PHF1-full-S 和 PHF1-full-A 引物(表 1); 以粳稻日本晴的 cDNA 为模板, 扩增得到 *OsPHF1* 基因的编码区, PCR 程序如下: 94℃下预变性 5 min; 98℃下变性 10 s, 56℃下复性 5 s, 72℃下延伸 1 min, 35 个循环; 72℃下保温 5 min。电泳检测, *OsPHF1* 的 PCR 产物大小为 1164 bp。将 *OsPHF1* 的全长序列克隆至 pMD-19 载体(TaKaRa), 用 T7 引物测序验证。

测序正确后的克隆, 用 *Xba* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 同时对双元表达载体 pCDMAR-Hyg^[15] 也进行 *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切, 胶回收对应的目的基因片段和载体大片段, 产物用 DNA 连接酶试剂盒(DNA ligase Kit, TaKaRa)进行连接, 转化至大肠杆菌中, 阳性克隆子经 PCR 和测序验证。选择测序正确的 pCDMAR-*OsPHF1* 重组子的菌液保存并提取质粒, 利用液氮冻融法将 pCDMAR-*OsPHF1* 质粒转入到农杆菌 GV3101 感受态细胞内, 随机挑取单克隆进行 PCR 检测, 扩增引物为 PHF1-full-F 和 PHF1-full-R。检测呈阳性者作为遗传转化菌株。

1.3 水稻的遗传转化及 PCR 检测

农杆菌介导的水稻遗传转化采用胡张华等^[19]建立的水稻转化体系, 步骤包括菌液的制备、侵染、共培养、脱菌和分化及生根培养等五部分。制备菌

液($OD_{600}=0.2\sim0.3$), 用菌液侵染水稻愈伤组织, 共培养 2 d 后, 在含有 40 mg/L 卡那霉素、400 mg/L 头孢霉素的分化培养基上培养, 培养约 2 周后需要继代, 待抗性苗生长至一定高度, 转移到生根培养基上(含潮霉素 B 40 mg/L)进行筛选和生根培养。

利用 CTAB 法提取抗性苗叶片 DNA, 利用 pCDMAR-*OsPHF1* 载体特异性引物(PHF1-7S 和 PHF1-10A, 表 1)进行 PCR, PCR 条件如下: 95℃下变性 5 min; 95℃下变性 30 s, 60℃下退火 30 s, 72℃下延伸 30 s, 35 个循环; 72℃下保温 3 min。反应结束后, 用 1%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 筛选阳性转基因株系, 统计阳性率。根据 T₂ 代的 PCR 鉴定结果, 统计基因分离情况, 筛选出带有单拷贝目的基因且无筛选标记基因的纯合株系。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 *OsPHF1* 基因表达量

利用 RNA 提取试剂盒(Plant RNA Extraction Kit, TaKaRa)提取生长 30 d 左右的无筛选标记的纯合转基因株系及野生型水稻幼苗叶片总 RNA。利用逆转录试剂盒(Invitrogen, Superscript III RT Kit)逆转录成 cDNA, 用实时荧光定量 PCR 和引物 *OsPHF1*-418S 和 *OsPHF1*-633A 检测 *OsPHF1* 表达量(TaKaRa 公司 real-time quantitative PCR kit) PCR 参数和试剂配置参照说明书进行。以 *UBIQUITIN* 基因为内参(引物 Ubi-S 和 Ubi-A 见表 1), 利用 2^{-ΔΔC_t} 法分析定量数据, 3 次重复。计算不同株系中 *OsPHF1* 的相对表达量。

1.5 大田试验设计

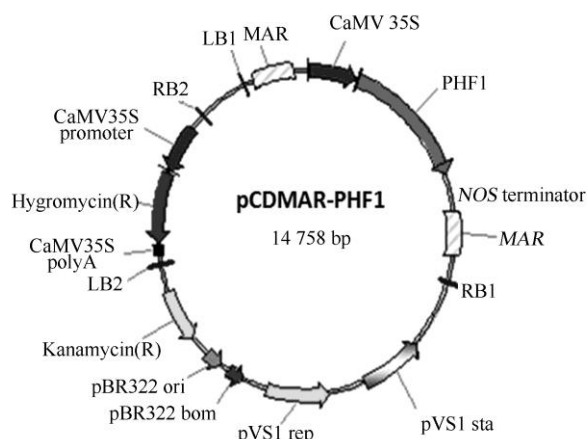
采用纯合的 T₃ 和 T₄ 材料进行大田试验, 采用随机区组设计, 3 个重复, 每个小区 10 株×10 株, 株距 15 cm, 行距 25 cm, 考种时取中间 1m² 内的植株(12~15 株)统计农艺学性状。

上海基地: 设置低、中、正常三个磷肥水平, 分别施过磷酸钙 75、300、450 kg/hm²。三块地中其

表 1 本研究所用引物

Table 1. Primers used in the study.

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
PHF1-full-S	GCTCTAGAATGGCAGGCGGCGGAGGTGGCGAG(<i>Xba</i> I)
PHF1-full-A	CGCTCGACTCACCAGGGTTCTGGTCCTCAGG(<i>Sal</i> I)
HYB-3S	TGAAAAAGCCTGAACCTACCG
HYB-4A	TATTTCTTTGCCCTCGGACG
PHF1-7S	GATGGGAAGTATCTGGCTTTGGG
PHF1-10A	AACAGGATGGCTGACACTAGGAA
PHF-418S	CTCAGAATATTTCAATTGGCCGAGC
PHF-633A	CCTAGAAAAGCGCAACATTCAATCTTC
Ubi-S	GACGACGCACCCCTGGCTGACTAC
Ubi-A	TGCTGCCAATTACCATATACCACGAC



LB1 和 LB2 为 T-DNA 左边界, RB1 和 RB2 为 T-DNA 右边界; Hygromycin(R) 为潮霉素磷酸转移酶基因, 潮霉素抗性筛选标记; MAR 为核基质附着区序列; CaMV 35S 为花椰菜花叶病毒启动子。LB1 和 LB2, Left border of T-DNA; RB1 and RB2, Right border of T-DNA; Hygromycin(R), Hygromycin phosphotransferase (*HPT*), resistant to hygromycin B; MAR, Matrix attachment regions; CaMV 35S, 35S promoter of CaMV.

图 1 重组载体 pCDMAR-OSPHF1 的构建

Fig. 1. Construction of overexpression vector of pCDMAR-OSPHF1.

他营养元素的施肥量相同, 均为尿素 300 kg/hm²; 氯化钾 150 kg/hm²。所用氮、磷、钾肥分别为尿素(含 N 46%)、过磷酸钙(含 P₂O₅ 12%)和氯化钾(含 K₂O 60%)。氮肥的 50% 作基肥、25% 作分蘖肥、25% 作穗肥; 磷肥全部作基肥施用; 钾肥的 70% 作基肥, 30% 作穗肥。

海南省三亚基地: 设置低、中、正常三个磷施肥量水平, 过磷酸钙施用量分别为 112.5、225 和 450 kg/hm²。三块地中其他营养元素肥料施肥量相同, 均为尿素 450 kg/hm²; 氯化钾 300 kg/hm²。施肥管理同上。

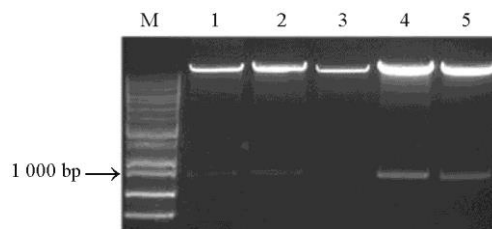
1.6 农艺性状分析

大田试验中水稻材料全部成熟后, 统计大田试验中转基因材料的株高、分蘖数、结实率、单株产量、千粒重等性状。株高用直尺测量地面至植株最高穗子顶端的距离。分蘖数则是记录有效分蘖的数量。每个小区中每个品种选择 12 个单株。单株的所有种子全部采收至网袋, 45℃ 下烘 3~5 d, 称量, 作为单株产量统计分析。用 Excel 2010 和 SPSS 等软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsPHF1* 基因的克隆及植物表达载体的构建

用 RT-PCR 从水稻叶片中获得 *OsPHF1* 基因的



重组载体 pCDMAR-OSPHF1 的双酶切鉴定(*Xba* I 和 *Sal* I)。泳道 1~5 为 5 个不同单克隆, 其中, M 为 DNA 标记; 克隆 1、2、4、5 酶切后能得到约 1 kb 的片段, 为阳性克隆。

Confirmation of recombinant plasmid pCDMAR-OSPHF1 by double enzyme digestion. Lanes 1-5, Five independent clones of recombinant plasmid. M represents DNA marker; A band about 1 kb appears at lanes 1, 2, 4 and 5, indicating that they are positive cloneion.

图 2 pCDMAR-OSPHF1 过表达载体的双酶切验证

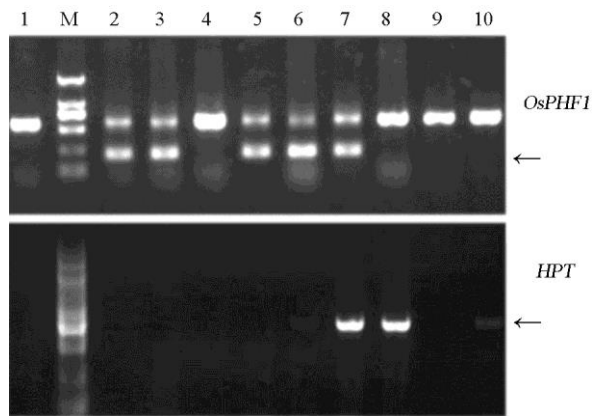
Fig. 2. Confirmation of recombinant plasmid pCDMAR-OSPHF1 by double enzyme digestion.

全长 CDS, 目的片段长度与数据库公布的 CDS 长度相同, 为 1164 bp, 共编码 387 个氨基酸。将该片段连接到 T 载体上, 通过测序分析目的片段序列, 并与网站中序列进行比对验证, 得到正确的克隆子。随后, 利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 对 *OsPHF1* 目的基因的 CDS 片段和 pCDMAR-HYB 载体分别进行双酶切, 再进行连接, 重组载体命名为 pCDMAR-OSPHF1, 载体构建示意图见图 1。将连接产物转化入大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 随机挑取单克隆经 PHF1-full-F 和 PHF1-full-R 引物 PCR 验证并提取质粒进行双酶切检测, 最终将阳性质粒送公司测序检测。测序结果表明, *OsPHF1* 基因已经重组到 pCDMAR 载体上, 没有碱基序列突变, pCDMAR-OSPHF1 载体构建成功(图 2)。将构建成功的重组质粒转化到农杆菌 GV3101 中, 用于后续的转基因实验。

2.2 pCDMAR-OSPHF1 载体在水稻中的遗传转化与后代检测

通过农杆菌介导的遗传转化将 pCDMAR-OSPHF1 载体导入粳稻空育 131, 获得了 92 株潮霉素抗性的 T₀ 幼苗, 抽提 T₀ 叶片 DNA 基因组, 进行载体特异性片段 *OsPHF1* 的 PCR 检测。得到 20 个 *OsPHF1* 阳性植株。该双 T-DNA 载体(pCDMAR)转化粳稻空育 131 的转基因植株的效率为 21.7%。

对 T₀ 阳性材料的后代(T₁), 在幼苗期进行潮霉素抗性基因 *HPT* 和插入基因 *OsPHF1* 的双基因鉴定(图 3), 筛选出无抗性标记基因是含目的插入基因 *OsPHF1* 的 4 个转化株系: F18、F22、F25 和 F32。同时, 对这 4 个转基因株系进行了 *OsPHF1* 分离比检测(表 2)。发现 F18、F22、F25、F32 这 4 个株系



M—DNA 标记；1—空育 131(对照)；2~10—不同转 *OsPHF1* 基因 T_1 代株系。上排 1~10 为 *OsPHF1* 基因扩增情况，插入的 *OsPHF1* 的扩增产物为 215 bp(箭头所指)，基因组中扩增产物为 600 bp。下排为相同模板对应的筛选标记 *HPT* 基因扩增情况，产物为 1000 bp(箭头所指)。泳道 2, 3, 5, 6 为转基因品系 F18, F22, F25, F32。M, DNA marker. Lane 1, Kongyu 131(control); 2-10, PCR results for different *OsPHF1* transgenic T_1 lines' genomic DNA. Upper row is the amplification of *OsPHF1* gene, and the amplified product of the inserted *OsPHF1* is 215 bp, while the endogenous *OsPHF1* in the genome is 600 bp. The bottom row represents the amplification of *HPT* gene, and the product is 1000 bp. Lanes 2, 3, 5 and 6 represent transgenic lines of F18, F22, F25 and F32, respectively.

图 3 T_1 水稻中潮霉素抗性筛选标记 *HPT* 和插入基因 *OsPHF1* 的双基因 PCR 鉴定
Fig. 3. PCR analysis of *OsPHF1* gene and selective marker *HPT* in T_1 transgenic plants.

的子代中插入基因 *OsPHF1* 的分离比均符合 3 : 1 (单基因插入)的卡方测算。可见这 4 个品系中 *OsPHF1* 均是单拷贝插入的。双元表达载体转基因目地基因阳性的转基因材料后代获得无筛选标记

表 2 T_1 代转基因水稻中插入基因 *OsPHF1* 分离比鉴定
Table 2. Identification of separation ratio for the inserted gene *OsPHF1* in T_1 generation transgenic rice.

株系名称 Line name	检测的总株数 Total number of detected plants	含有插入的 <i>OsPHF1</i> 株数 Plant number containing inserted <i>OsPHF1</i>	不含插入的 <i>OsPHF1</i> 株数 Plant number without inserted <i>OsPHF1</i>	χ^2 (3: 1)
F18	57	39	18	1.32
F22	56	45	11	0.86
F25	56	40	16	0.38
F32	60	43	17	0.36

表 3 荧光定量 PCR 检测不同转基因株系中 *OsPHF1* 的总表达量
Table 3. The total relative expression of *OsPHF1* in three independent overexpression transgenic plants by real-time PCR.

株系名称 Line name	<i>OsPHF1</i> 相对表达量 (叶) Relative expression of <i>OsPHF1</i> (Leaf)	<i>OsPHF1</i> 相对表达量 (根) Relative expression of <i>OsPHF1</i> (Root)
F18-18	0.38±0.03 b	0.05±0.00 a
F22-32	16.17±4.57 d	1.42±0.94 b
F25-6	12.92±1.11 c	1.28±0.89 b
空育 131 Kongyu 131	0.20±0.03 a	0.07±0.01 a

同列数据后跟相同字母者代表株系间差异未达 0.05 显著水平。
values followed by same letters are not significantly different at 0.05 probability level.

的转基因材料的效率是 20%。
通过对 T_2 代 F18、F22、F25 和 F32 的基因型鉴定，筛选出无筛选标记且 *OsPHF1* 过表达纯合的 3 个单株 F18-18、F22-32、F25-6。对纯合株系 F18-18、F22-32 和 F25-6 的后代(T_3)，先利用实时荧光定量 PCR 对苗期内源基因 *OsPHF1* 的总表达量进行了检测(定量引物对 PHF-418S/PHF-633A，表 3)。在 3 个纯合株系中，F22-32 的叶片和根中 *OsPHF1* 的表达量最高，与对照空育 131 相比分别提高了约 80 倍和 20 倍；F25-6 叶片和根中 *OsPHF1* 的表达量也明显增加，约为对照的 65 倍和 17 倍；而 F18-18 中 *OsPHF1* 的表达在叶中虽略有上升，增加幅度也不足 2 倍，在根中与对照比变化很小。可见 F22-32 和 F25-6 为更高效的 *OsPHF1* 过表达株系。

2.3 农艺性状

种植在上海基地的 F22-32 和 F25-6 的 T_3 代及对照空育 131 在不同磷浓度营养的大田下的农艺性状统计情况见表 4。在磷元素明显缺乏的低磷田中(过磷酸钙 75 kg/hm²，有效磷浓度为 3.93 kg/hm²)，过表达 *OsPHF1* 转基因植株 F22-32 和 F25-6 单株产量略高于对照，相对增加量约为对照的 15%~21%。其他农艺性状，如分蘖数、千粒重、结实率与对照比无明显差异。在磷元素中度缺乏的中低磷田(过磷酸钙 300 kg/hm²，有效磷浓度为 15.72 kg/hm²)，过表达 *OsPHF1* 转基因植株 F22-32 和 F25-6 在单株产量明显优于对照，增加 25%~34%。转基因株系的有效分蘖数比对照增加 38%~55%。千粒重和结实率等统计无显著差异。在正常磷田(作物正常生长营

表 4 T_3 代 *OsPHF1* 转基因植株在上海基地的农艺性状
Table 4. Agronomic traits of *OsPHF1* transgenic plants (T_3 generation) at Shanghai base.

施磷肥量 P application (/kg·hm ⁻²)	株系名称 Line name	T ₃ 植株, 上海基地 T ₃ at Shanghai base				T ₄ 植株, 海南省三亚基地 T ₄ at Sanya base, Hainan Province	
		分蘖数	单株产量	千粒重	结实率	分蘖数	单株产量
		Tiller number	Yield per plant /g	1000-grain weight /g	Seed-setting rate /%	Tiller number	Yield per plant /g
112.5	F22-32	16.44±4.16 a	13.26±2.71 b	27.64±2.29 a	94±4 a	23.33±2.94 ab	40.36±6.32 b
	F25-6	16.20±5.16 a	12.61±2.50 b	26.98±2.71 a	93±6 a	22.83±3.49 ab	38.62±8.21 b
	空育 131 Kongyu 131	15.20±4.62 a	10.90±2.75 a	27.29±2.36 a	95±4 a	19.83±1.47 a	29.70±5.31 a
225.0	F22-32	23.60±6.33 a	19.18±5.13 b	30.13±2.39 a	91±8 a	23.60±2.61 ab	36.91±4.02 b
	F25-6	21.50±4.30 a	17.89±3.43 b	29.23±2.10 a	92±6 a	22.67±4.18 ab	37.29±7.91 b
	空育 131 Kongyu 131	15.15±3.20 b	14.27±2.00 a	28.41±2.33 a	94±5 a	20.67±3.08 a	31.74±6.39 a
450.0	F22-32	21.75±2.14 a	20.83±3.76 a	29.37±2.03 a	92±6 a	25.60±4.33 a	40.91±4.52 a
	F25-6	21.91±3.44 a	20.02±3.06 a	29.97±2.84 a	93±7 a	24.67±3.78 a	39.29±5.31 a
	空育 131 Kongyu 131	22.89±3.76 a	22.28±3.61 a	30.52±2.54 a	95±5 a	29.67±3.28 a	42.70±6.11 a

同一施肥水平, 同列数据后跟相同字母者代表株系间差异未达 0.05 显著水平。
At the same P application level, values followed by same letters are not significantly different at 0.05 probability level.

养条件下, 有效磷浓度为 23.58 kg/hm²), F22-32 和 F25-6 未表现出优势。F22-32 和 F25-6 的 T_4 代在海南三亚基地也进行了 3 个磷浓度的小区试验。F22-32 和 F25-6 株系在低磷田地中(过磷酸钙 112.5 kg/hm², 有效磷浓度为 5.82 kg/hm²), 与对照亲本空育 131 相比, 分蘖数略有增加, 单株产量增加 30%~35%。在中低磷条件下(过磷酸钙 225 kg/hm², 有效磷浓度为 11.625 kg/hm²), F22-32 和 F25-6 株系分蘖数仍略高于亲本, 单株产量增加 16%~18%(表 4)。株高、千粒重和结实率未有明显差异(未列出)。在正常磷田(施肥有效磷浓度为 23.58 kg/hm²), F22-32 和 F25-6 农艺性状未表现出优势。

3 讨论

农业生产中的磷肥主要来自磷矿, 而磷矿是一种不可再生资源, 在人类不断开采利用下日益减少。美国地质勘探的数据显示, 2008 年全球磷酸盐开采总量为 1.6 亿 t, 而化肥的需求量在未来 5 年内将以每年 2.5%~3.0%的速率增长。长此以往, 世界磷矿资源只能再支撑人类需求 125 年左右^[16]。同时, 过度施用的磷也会造成水质富营养化。因此, 改善作物对磷素的吸收和利用对生态和农业经济都具有重要意义。

作物产量的形成以作物对营养元素的吸收能力以及同化物向经济器官运输能力为基础^[5]。通过增强对外界环境磷元素的吸收量来提高其磷素的利用效率是培育磷高效作物的有效途径。当前, 针

对植物磷吸收分子机理的研究已取得了很大的进展, 这为通过转基因手段培育磷高效作物奠定了坚实的基础。Chen 等^[14]克隆了水稻的 *OsPHF1* 基因, 并进行了系统的功能研究, 他们还发现籼稻 9311 中过表达 *OsPHF1* 可以在低磷胁迫环境中提高磷的吸收利用效率, 并促进分蘖和穗的发育, 提高产量^[15]。本研究将 *OsPHF1* 转入粳稻空育 131 中, 获得了无选择标记的过表达 *OsPHF1* 的转基因株系; 经过多代、多点田间试验, 发现在低磷、中低磷环境下, 转基因株系有效分蘖数和单株产量稳定增加, 而在正常磷条件下, *OsPHF1* 转基因没有增产效果; 表明在粳稻中过表达 *OsPHF1*, 同样具有提高磷利用效率的作用。这些研究结果为该基因的大规模应用提供了依据。

植物遗传转化中, 需要使用选择性标记基因来筛选转化子。目前使用标记基因多为卡那霉素、潮霉素等抗性基因。大量种植带有上述基因的转基因植物具有潜在的安全性风险, 比如标记基因编码产物对人类或者牲畜可能具有潜在毒性及致敏性, 标记基因可能被转移到人或动物的肠道微生物中, 使其产生耐药性; 其次, 标记基因有可能会通过基因漂移传播到其他生物体中, 威胁生态环境。因此, 培育无选择标记的转基因植物无论是从安全性考虑, 还是从转基因技术本身考虑均具有重要意义。目前已报道的无标记技术主要包括双 T-DNA 法、双农杆菌双载体法以及利用体内重组去除标记基因法等^[20]。我们采用效率高又便捷的双 T-DNA 法,

分别将 *OsPHF1* 和潮霉素抗性基因 *HPT* 构建到同一载体的两个 T-DNA 区域中, 进行转化, 使两个 T-DNA 插入同一受体的不同位点, 目的基因与标记基因在后代会发生分离, 进而成功地筛选出无选择标记基因、仅含标记基因的转基因后代材料。

本研究从 92 个潮霉素抗性转基因植株中, 鉴定到 20 个带有 *OsPHF1* 的株系, 最终从 20 个株系中获得了 4 个无筛选标记的 *OsPHF1* 过表达转基因株系, 表明该双 T-DNA 载体(pCDMAR)转化粳稻空育 131 获得转基因频率为 21.7%, 从转基因材料筛选出无标记的效率为 20%。Komari 等^[17]发现双 T-DNA 载体转化水稻, 效率为 14%~47%, 可能与载体、导入的目的基因及水稻受体的基因型有关。

本研究获得了无筛选标记的纯合转基因品系, 一方面为深入研究 *OsPHF1* 在不同浓度磷环境中对作物对营养元素的吸收和利用提供了新的材料; 另一方面, 这些无选择标记的转基因纯系材料在低磷环境中生长良好, 单株产量明显高于对照野生型, 因此在水稻高产高效育种上具有很大的应用潜力。另外, 表明 *OsPHF1* 具有广泛的应用潜力, 可为我国未来粮食安全及绿色农业经济提供保障。

谢 锋: 感谢浙江大学植物生理学和生物化学国家重点实验室提供 *OsPHF1* 基因载体。

参考文献:

- [1] Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 447-453.
- [2] Wang F, Deng M J, Xu J M, Zhu X L, Mao C Z. Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. *Sem Cell & Dev Biol*, 2018, 74: 114-122.
- [3] Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(19): 10519-10523.
- [4] Rae A L, Cybinski D H, Jarmey J M, Smith F W. Characterization of two phosphate transporters from barley: Evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(1): 27-36.
- [5] Raghothama K G. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3): 182-187.
- [6] Mudge S R, Rae A L, Diatloff E, Smith F W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 31(3): 341-353.
- [7] Jia H, Zhang S, Wang L, Yang Y, Zhang H, Cui H, Shao H, Xu G. OsPht1;8, a phosphate transporter, is involved in auxin and phosphate starvation response in rice. *J Exp Bot*, 2017, 68(18): 5057-5068.
- [8] Shin H, Shin H S, Dewbre G R, Harrison M J. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J*, 2004, 39(4): 629-642.
- [9] Wang C, Yue W, Ying Y, Wang S, Secco D, Liu Y, Whelan J, Tyerman S D, Shou H. Rice SPX-Major facility superfamily3, a vacuolar phosphate efflux transporter, is involved in maintaining phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiol*, 2015, 169(4): 2822-2831.
- [10] Karthikeyan A S, Varadarajan D K, Mukatira U T, D'Urzo M P, Damsz B, Raghothama K G. Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol*, 2002, 130(1): 221-233.
- [11] Barlowe C, Schekman R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, 1993, 365(6444): 347-349.
- [12] Barlowe C. Signals for COPII-dependent export from the ER: What's the ticket out? *Trends Cell Biol*, 2003, 13(6): 295-300.
- [13] Gonzalez E, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J. PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3500-3512.
- [14] Chen J, Liu Y, Ni J, Wang Y, Bai Y, Shi J, Gan J, Wu Z, Wu P. *OsPHF1* regulates the plasma membrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157(1): 269-278.
- [15] Wu P, Shou H X, Xu G H, Lian X M. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16(2): 205-212.
- [16] Gilbert N. Environment: The disappearing nutrient. *Nature*, 2009, 461(7265): 716-718.
- [17] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 1996, 10(1): 165-74.
- [18] 韩兆雪, 曹墨菊, 朱祯, 荣廷昭. *DREB* 基因双 T-DNA 植物表达载体的构建及验证. 分子植物育种, 2004, 2(1): 7-12.
- Han Z X, Cao M J, Zhu Z, Rong T Z. Construction and

- verification of double T-DNA plant expression vector of the *DREB* gene. *Mol Plant Breed*, 2004, 2(1): 7-12. (in Chinese with English abstract)
- [19] 胡张华, 吴关庭, 金卫, 王伏林, 陈锦清. 农杆菌介导的水稻转化及 *bar* 基因稳定遗传. 浙江农业学报, 2003, 15(6): 327-331.
Hu Z H, Wu G T, Jin W, Wang F L, Chen J Q. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice and stable inheritance of *bar* gene. *Acta Agric Zhejiang*, 2003, 15(6): 327-331. (in Chinese with English abstract)
- [20] 于恒秀, 陆美芳, 陈秀花, 龚志云, 刘巧泉, 顾铭洪. 不同转化方法培育无抗性选择标记转基因水稻效率的比较. 中国水稻科学, 2009, 23(2): 120-126.
Yu H X, Lu M F, Che X H, Gong Z Y, Liu Q Q, Gu M H. Comparison on efficiency of generating selectable marker-free transgenic rice by different transformation methods. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23(2): 120-126. (in Chinese with English abstract)

欢迎订阅2019年《中国农业科学》

《中国农业科学》是由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办的综合性学术期刊, 是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国精品科技期刊、CSCD Q1区期刊、中国权威学术期刊A+期刊、中国最具国际影响力学术期刊, 是了解中国农业相关领域科研进展的首选期刊。《中国农业科学》以研究论文、综述、简报等形式报道农牧业基础科学和应用基础科学最新成果。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学; 耕作栽培·生理生化·农业信息技术; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 食品科学与工程; 畜牧·兽医·资源昆虫等栏目。读者对象为国内外农业科研院(所)、大专院校的科研、教学与管理人员。

《中国农业科学》大16开, 每月1、16日出版, 国内外公开发行。每期200页, 定价49.50元, 全年定价1188.00元。国内统一连续出版物号: CN11-1328/S, 国际标准连续出版物号: ISSN 0578-1752, 邮发代号: 2-138, 国外代号: BM43。

《中国农业科学》全国各地邮局均可订阅, 也可直接向编辑部订购。

邮编: 100081; 地址: 北京中关村南大街12号《中国农业科学》编辑部;

电话: 010-82109808, 82106281; 传真: 010-82106247;

网址: <http://www.ChinaAgriSci.com>; E-mail: zgnykx@caas.cn;

联系人: 林鉴非。

欢迎订阅2019年Journal of Integrative Agriculture (JIA)

《农业科学学报》(Journal of Integrative Agriculture, JIA) 由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办, 是综合性英文学术期刊, 月刊。JIA前身为2002年创刊的《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China, ASC), 2012年更名为JIA。JIA 2006年起与Elsevier合作, 全文数据在ScienceDirect平台面向世界发行; 2009年被SCI收录, 最新影响因子为1.042, 位于JCR农业综合类Q2区前列位次。JIA是中国科技核心期刊; 连续5年获得“中国最具国际影响力学术期刊”称号; 2016年入选中国科协“中国科技期刊国际影响力提升计划”及“中国科技期刊登峰行动计划”项目, 是我国农业领域领衔学术期刊, 并具有较高国际影响力。

JIA大16开, 每月20日出版, 国内外公开发行。每期180页, 国内订价80.00元, 全年960.00元。国内统一连续出版物号: CN 10-1039/S; 国际标准连续出版物号: ISSN 2095-3119; 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

全国各地邮局均可订阅, 也可直接向编辑部订购。

邮编: 100081; 地址: 北京中关村南大街12号《中国农业科学》编辑部;

电话: 010-82109808; 传真: 010-82106247;

网址: <http://www.ChinaAgriSci.com>; E-mail: zgnykx@caas.cn;

联系人: 林鉴非。