第2卷 第1期
1996年3月

植物营养与肥料学报
PLANT NUTRITION AND FERTILIZER SCIENCE

Vol.2 No.1
Mar. 1996

植物营养分子遗传研究进展

吴 平 罗安程 倪俊建 章永松

（浙江农业大学土化系，杭州 310029）

摘 要

过去10年间，在植物矿质养分吸收利用与养分胁迫诱导调节机理分子生物学方面的研究进展使我们对植物营养分子遗传背景有了新的了解。本文对有关养分转运子基因克隆，养分胁迫诱导调节机理，应用分子标记技术研究养分吸收利用遗传背景等方面的研究进展及方法作一介绍。

关键词 植物营养 分子遗传 研究进展

化肥资源的紧缺与肥料利用率低水平的矛盾是土壤植物营养科学长期以来致力于解决的问题。化肥资源的浪费包括养分的流失，挥发损失及在土壤中的无效性固定。土壤本身及大量固定的养分使土壤成为潜在的养分资源库。因此，提高化肥效率应包括作物对化肥的吸收利用率的提高和作物活化土壤养分能力的提高。我国大面积的粮食增产的最大潜力是在大面积的中低产田上提高单产。养分逆境是中低产田的主要限制因素之一，如我国南方的酸性红壤与北方的碱性土壤对磷的化学固定；潜育性稻田磷的活度系数降低；酸性土壤的铝害及石灰性土壤缺铁、锌等。这些逆境因子往往限制了良种的增产潜力，成为试验与大田实际产量差的主要原因之一[1]。土壤改良在一定程度可缓解养分逆境条件，但大面积的土壤改良，尤其是亚耕层土壤的改良受制于成本、资源、技术及实际推广的可行性。因此，人们希望通过遗传改良培育适应特定土壤环境逆境及养分高效吸收利用的优良品种，从根本上解决上述问题[8]。植物不同基因型吸收利用土壤养分效率及耐土壤养分逆境的显著差异的事实，为养分高效利用良种工程提供了科学依据。建立有效的筛选，收集及开发优良基因资源的技术系统，深入了解植物高效养分吸收利用基因背景对有关的良种工程实践是必要的。随着现代生物技术的迅速发展及广泛的应用，植物养分高效吸收利用分子生物学研究近10年来在国际上方兴未艾，并取得较大进展。本文就有关研究进展及方法作一简述。

一、养分胁迫诱导调节机理

植物具有特定的养分胁迫诱导遗传调节系统，在微生物方面已有较深入研究。早在70年代及80年代初，人们在大肠杆菌中已发现受介质磷素营养控制表达的基因（Phosphate-regulated genes）。这些磷调节基因大多为磷饥饿诱导（Phosphorus starvation induced）表达基因（psi基因），编码磷跨模转运通道蛋白及从有机磷酯中分解出无机磷的酶[4,7,26,44]。以后的研究进一步明确psi基因系统是一磷调节子（Phoregulon），即受控于同一调节蛋白的多个操纵子[35,40,43,45]。已知大

收稿日期：1995-08-03

肠杆菌psi基因至少有20～25个，其大部分受PhoB与PhoR基因调节。较为明确的有编码分泌性碱性磷酸酶基因(PhoA)及Pi高效跨膜转运基因(Pst)。PhoA转录受调节子PhoB，PhoM和PhoR调节。PhoB编码的DNA结合蛋白(mol wt 29KD)通过磷调节子启动子区域不同部位的结合，启动不同的Psi基因表达。PhoM和PhoR对PhoA的表达是必要的，PhoR产物是抑制剂，因PhoR调节组成碱性磷酸酶合成；而PhoM调节碱性磷酸酶合成依赖于PhoR，PhoR调节功能也依赖于PhoM。目前磷调节子产物还无分离。与大肠杆菌相似的Psi基因系统在真菌(酵母)中已发现[20,45]。养分胁迫诱导表达基因系统受同一调节因子调控的机理在红色面包霉(*Neurospora Crassa*)硫胁迫诱导遗传系统及硝酸根诱导硝态氮吸收系统中也已发现[9,10]。这些研究结果表明，调节基因及调节子启动区域结构是养分胁迫或养分供应诱导系统中的关键因素。但胁迫信号如何传递至核DNA仍不清楚。

高等植物中是否存在与微生物相似的养分胁迫诱导系统还无一般性结论，但已有的研究结果表明了存在的可能性。西红柿磷胁迫筛选的突变细胞株系表现较高的磷吸收力，其分泌性酸性磷酸酶活性在磷胁迫条件下显著比对照细胞系高，但在磷充分供应条件下则无显著差异；同时磷胁迫只诱导分泌性酸性磷酸酶活性而不影响细胞内磷酸酶活性[12,13]。在磷胁迫条件下，分泌性酸性磷酸酶活性基因型差异在不同作物均有发现，如水稻[19]，小麦[17]，西红柿[21]及烟草[14]。但对这种差异的分子遗传背景仍了解不多。

二、高效养分转运子基因分离与克隆

作为膜组成蛋白的养分转运子(Nutrient transporter)是离子跨膜转运载体，离子通道(Channel)及离子交换子(Exchanger)的总称[6]。高效养分转运子基因应被定义为在养分胁迫或养分存在(如NO_3^-)诱导表达的特定基因。诱导蛋白的产生或增加反应诱导基因的表达或表达增强。分离克隆养分转运子结构基因的方法有多种，从目前报道的文献来看主要有：

(一)依赖于mRNA或诱导蛋白提供的信息

特异mRNA可通过对已筛选的耐养分胁迫及敏感基因型进行胁迫处理或对耐胁迫基因型进行胁迫及非胁迫处理，提取总RNA，寡聚(dT)纤维素选择分离mRNA[23]，Northern印迹及杂交分析检测。Mori等人[25]用从缺铁特异重组DNA(cDNA)文库中筛选的cDNA作探针，对铁胁迫和铁满足供应处理后的大麦(*Hordeum vulgare L.*)根茎mRNA进行Northern杂交，检测到根系缺铁诱导表达基因的cDNA(Ids2)，应用这种方法，显然特定的cDNA文库构建是前提(如上述的缺铁cDNA文库)。对一些含量较高的转运子，养分供应状态可提供足够的诱导表达差异，即转运子及mRNA能为反转录合成互补DNA或根据诱导蛋白提供的氨基酸序列设计简并探针提供足够的信息，则可用互补DNA或构建的简并探针检测目标DNA。这种探针至少可检测到与其大部分序列互补的DNA片断。目前已成功地从拟南芥(*Arabidopsis*)中分离克隆质子泵(H^+-ATPase)[16,29]，液泡膜焦磷酸酶(H^+-PPase)[30]，钾通道基因[34]；从菠菜叶绿体中分离了无机磷交换子(Pi exchanger)(Flugge et al. 1991)及从蓝细菌(Cyanobacteria)中分离了硫酸盐转运子(Sulphate transporter)基因[15]。上述方法的技术路线如图1所示。

(二)异源基因表达筛选方法

对于含量甚微的养分转运子，养分供应状况无法提供足够的特异mRNA信息，微量的膜蛋

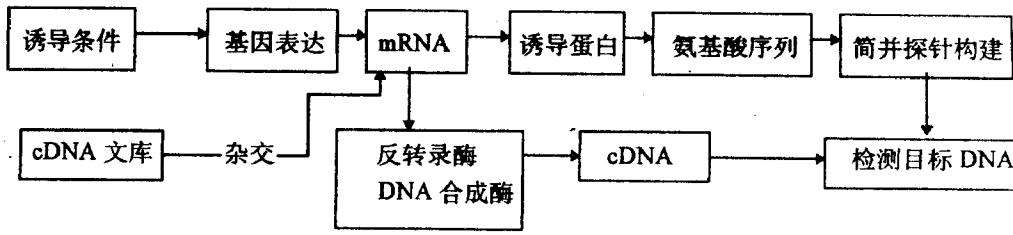

图1 养分胁迫诱导表达基因分离与克隆技术路线之一

Figure 1 One of strategies for identifying and cloning genes with nutrient-induced expression

白分离纯化也很困难，因此图1的技术路线无法有效地应用。在这种情况，可考虑利用植物重组DNA(cDNA)在酵母中的异源表达筛选养分转运子结构基因。其方法的基本原理是向某种养分吸收缺失的酵母突变体转入带有植物(养分高效吸收基因型)cDNA插入的质粒，然后在特定培养基上筛选突变体。一旦获得某种养分吸收恢复突变体，插入的cDNA可作为探针从植物核DNA文库(Genomic library)中分离克隆某种养分转运子结构基因。应用这种方法需选择带有标记基因的酵母突变体，及确证该突变体只是某种养分吸收的突变而非其他养分的突变。Smith等人[37]用脲嘧啶合成缺失(ura3-)酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)，采用物理与化学诱变突变，产生的突变体用含有脲嘧啶，硫酸盐类似毒害物质硒盐或氯酸盐及作为唯一硫营养源的高半胱氨酸硫酸酯的培养基上选择，获得生长正常的突变体用于分离克隆拟南芥根系硫酸盐(SO_4^{2-})转运子基因，如图2所示。

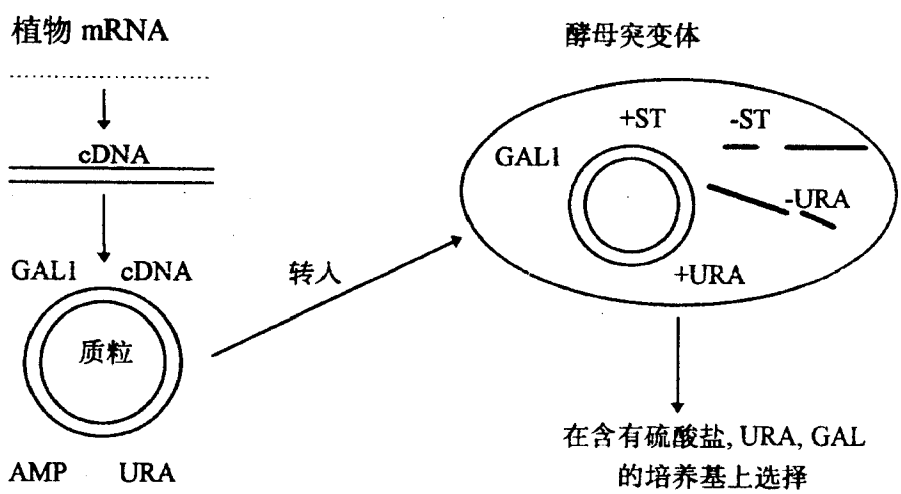

图2 利用酵母突变体异源基因表达方法从植物根系分离克隆硫酸盐转运子方法示意图

ST＝硫酸盐转运子，URA＝脲嘧啶，AMP＝氨苄青霉素(Ampicilin)，GAL＝半乳糖

Figure 2 Identifying and cloning a gene encoding for a sulphate transporter in plant roots using heterologous complementation of yeast mutants deficient in sulphate uptake.

ST = sulphate transporter, URA = uracil, AMP = ampicillin, GAL = glactose.

(三)突变遗传研究方法

通过突变体分析养分高效吸收代谢及抗元素毒害遗传背景在微生物学领域行之有效,在高等植物研究中也正在起到越来越大的作用。确定适当的胁迫压及选择技术以保证非专性突变体的致死条件是应用这种方法的关键所在。Feldman等人[11]用包括抗卡那霉素(Kanomycin)基因的农杆菌T-DNA插入构建了可以结子的拟籽楠芥突变体文库;Tsay等[39]用这一突变体文库,通过氯酸盐(ClO_3^-)抗性突变体筛选分离了硝酸盐转运子基因;利用有毒的硫酸盐类似物硒盐作为选择剂,筛选丧失硫酸盐吸收突变体的研究也正在英国Long Ashton研究中心进行。T-DNA插入突变基因检测可用插入的T-DNA作探针直接检测。

基因突变可从PCR产物在凝胶电泳上直接识别,如琼脂糖凝胶电泳(大约可区分相差100bp的DNA片断)产物可识别插入或确失引起的突变[18,36];对点位突变可由聚丙烯酰胺电泳(可区分5bpDNA片断)及内切酶切割位点分析(4碱基识别序内切酶)确定。因此PCR技术的应用将使抗元素毒害及营养缺陷型变异株的筛选大大提高效率。在细胞培养抗元素毒害株系的研究中,细胞水平的生理适应性往往使筛选失败,隐性基因效应也无法从细胞培养筛选中直接获得。对植物细胞来说,营养缺陷型变异已知和微生物一样是隐性遗传[3]。PCR产物的分析,为解决上述问题及研究细胞水平与整体植株水平抗性机理的遗传背景提供了便利。

(四)用外源基因作分子探针

现代生物技术在植物离子转运研究中最令人感兴趣的发现之一是,植物离子转运的"引擎"—细胞膜质子泵(H^+-ATPase)中ATP结合部位与已有深入研究的动物Na^+ / K^+泵是相同的。因此动物Na^+ / K^+泵基因的编码ATP结合部位的DNA片断可作为分子探针检测植物质子泵基因。如可以确定小片断DNA保守序列,则可应用DNA聚合链反应(PCR)技术[32]快速克隆基因。

三、养分高效吸收利用基因定位

限制性片断长度多态性(RFLP)是不同遗传背景材料DNA减基序列差异的表现。这种差异通过限制性内切酶特定识别序列产生切割DNA片断长度多态性而得到观察。由于RFLP标记直接反映DNA结构的差异,具有共显性,不受环境影响及DNA提取不受生育期限制等优点,RFLP技术为分析作物复杂遗传背景及基因定位提供了技术上的可行性。在过去10年间,各种重要农作物的RFLP遗传图谱已相继建立,有关应用RFLP技术进行基因定位的理论与方法及对作物各种重要农学性状的基因定位和遗传机理分析已有大量报道。在玉米磷吸收利用基因型差异遗传背景分析中发现磷吸收利用参数(吸收量与单位吸收磷生物量)与根系生物量及地上部生物量参数可检测到相同的相关RFLP标记[31],但表型参数无法明确提供各重要相关的代谢机理差异。

高密度RFLP遗传图谱的发展为在整个染色体组水平上分析突变基因及发展以分子标记指导的种质资源与育种材料选择奠定了基础。但RFLP分析的常规方法是建立在亲本性状具有显著差异,亲本杂交后代可育,满足分析要求的遗传群体建立,亲本RFLP标记筛选及群体RFLP标记基因型与性状分离的相关分析的基础上的。这不但耗时耗资,且受DNA探针数量,远缘杂交不育等因素限制。因此建立研究作物遗传群体的RFLP数据库后,如何充分利用建立的数据库于其他种质材料的基因定位是应用RFLP技术的重要方面。DNA聚合链反应(PCR)[32]的发展使

在DNA水平上快速诊断考察基因突变成为可能。PCR分析的主要限制因素是对检测DNA片断序列的了解以选择合适得引物[41]。以PCR技术为基础的随机扩增多态性DNA片断(RAPDs)技术是目前应用最广泛的DNA遗传诊断技术之一。与RFLP相比，RAPDs有程序简单，DNA用量少，检则灵敏，不受探针数量限制等优点。应用RAPDs技术讨论较多的问题是检测稳定性。在以RAPDs与RFLP技术分析油菜(*Brassica*)遗传相似性研究中，Santos等[33]发现以RAPDs与RFLP确定的各基因型遗传关系是一致的，其误差极大部分来自取样误差而非RAPDs与RFLP确定的DNA结构差异。在辐射诱变和自然诱变过程中水稻基因组变化的RFLP与RAPDs标记的一致性也已有报道[2]。但应指出，PCR参数设置对结果的稳定性是至关重要的，另一面，对于分子量较大的核DNA点位突变，用RAPDs检测并非易事。

结合RFLP与RAPDs技术是研究养分高效吸收利用基因背景的有效方法之一，在土壤条件下筛选研究参数的遗传变异对筛选养分高效吸收利用基因型是必要的。养分吸收利用农学诊断参数往往表现为数量性状。根据性状分布，选择极端差异植株用于RAPDs分析检测控制性状变异的基因位点的基本方法是：混合极端差异组植株的DNA(Pooling DNA)，RAPDs 分析两组混合DNA的多态性DNA片断，PCR克隆检测的特异DNA片断备制探针与已有RFLP数据库的群体DNA杂交进行连锁分析确定位点。正确应用这种方法取决于极端差异基因型选择尺度的确定。有关选择的遗传与统计学依据已有讨论[24,27,42]。

四、展　望

随着对植物养分高效吸收生理生化机理的了解及分子生物学技术的飞速发展，植物营养遗传改良的理论研究与实践已经引起土壤植物营养，农学，遗传及分子生物学各个领域的重视。在生物技术方面，分子标记遗传图谱正在向序列确定位点(Sequence-tagged sites: STSs)图谱发展[5,28]。STSs已有效地在人类染色体组物理图谱构建中应用。主要作物的物理图谱的建立已可以预期。物理图谱的建立将为应用分子标记技术进行基因定位，分离克隆，基因结构分析等提供极大的方便。分子标记指导选择技术的发展将使定向种质资源库的建立及快速育种材料选择提供新的方法。目前已广泛应用的差异法(Differential display)[22]对特异mRNA分离显示了其有效性。现代生物技术已成为植物营养高效吸收利用分子遗传机理研究的有力工具。植物营养高效吸收利用分子遗传机理的揭示对植物营养理论的发展与实践将作出重大贡献。

参 考 文 献

1 林毅夫等，1994：关于主要粮食作物单产潜力与增产前景的研究。北京大学中国经济研究中心报告。
2 陆军等，1993：科学通报，38(23)，2179。
3 内宫博文等，1987：植物基因工程技术(孙崇荣，李育庆译)，上海科技文献出版社，157～165。
4 Argast M and Boos M, 1980: J. Bacteriol, 143: 142～150.
5 Brashaw Jr. H D et al., 1994: Theor. Appl. Genet. 89: 167～178.
6 Clarkson D T and Hawkesford M J., 1993: In: Plant Nutrition from Genetic Engineering to Field Practice. N J Barrow (ed.), Kluwer Academic Publishers, 23～34.
7 Cox G B et al., 1981: J. Bacteriol. 116: 582～587.
8 Duncan R R and Baligar V C, 1990: In: Crops as enhancers of Nutrient Use. V. C. Baligar and R. R. Duncan(eds.) Academic Press Inc., 4.

9 Fu Y H and Marzluf G A, 1992: J. Biol. Chem. 265, 11942.
10 Fu Y H et al., 1990: In: Development Biology. Wiley-Liss, NY, 319～322.
11 Feldman K A et al., 1989: Science 243, 1351.
12 Goldstein A H et al., 1988: Plant Physiol. 87,711
13 Goldstein A H, 1991: Theor. Appl. Genet. 82,191
14 Garcia M and Ascencio J, 1992: J. Plant. Nutr. 15(11): 2491.
15 Green L S et al., 1989: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1949～1953.
16 Harper J F et al., 1989: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1234～1238.
17 Hiratel H, 1982: Soil Sci. Plant Nutr. 28: 543.
18 Higuchi R et al., 1988: Nature 332:543
19 Igaue Z et al., 1973: Agric. Biol. Chem. 37:941.
20 Kramer R A and Andersen N, 1980: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6541.
21 Kunneroua M, 1986: Biol. Plant. 28:270.
22 Liang P L et al., 1993: Nucleic. Acids Res. 21: 3264～3275.
23 Logmann L et al., 1987: Anal. Biochem. 163:16.
24 Lebowitz R J et al., 1987: Theor. Appl. Genet. 73:566.
25 Mori S et al., 1993: In: Plant Nutrition from Genetic Engineering to Field Practise. N. J. Barrow(ed.), Kluwer Academic Publishers, 147～150.
26 Morris H et al., 1974: J. Bacteriol. 119: 583～592.
27 Michelmore R W et al., 1991: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828.
28 Olson M et al., 1989: Science 254: 1434～1435.
29 Pardo J M and Serrano R, 1989: J. Biol. Chem. 264: 8557～8562.
30 Rea P A et al., 1992: In: Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes. Cooke D T and Clarkson D T (eds.), Plenum Press, New York, 25～38.
31 Reiter R S et al., 1991: Theor. Appl. Genet. 82:561.
32 Saiki R K et al., 1985: Science 230: 1350.
33 Santos J B dops et al., 1994: Theor. Appl. Genet. 87: 909～915.
34 Sentenac H et al., 1992: Science 256:663～665.
35 Shinagawa H et al., 1987: In: Phosphate Metaolism and Cellilar Regulation in Microorganisms. A. Torriani et al.(eds.), Amer. Sci. Microbiol., Washington, 20～25.
36 Shin R K et al., 1990: Science 230:1350.
37 Smith F W et al., 1993: In: Plant Nutrition from Genetic Engineering to Field Practise.
38 Barrow N. J. (ed.), Kluwer Academic Publishers, p151～156.
39 Tsay Y F et al., 1993: Cell 72:705.
40 Torriani A and Ludke D N, 1985: In: the Molecular Biology of Bacterial Growth, H. Schaechter(ed.), Jones and Bartlett, Boston MA, 224.
41 Williams J G K et al., 1990: Nucleic Acids Research.18:6531.
42 Wang G L and Paterson A H, 1994: Theor. Appl. Genet. 88:355.
43 Wanner R J and Mcscharry R J, 1987: J. Mol. Biol. 158:347.
44 Willsky G R et al., 1973: J. Bacteriol. 113: 529～539.
45 Yoshida K Z et al., 1987: In: Microorganisms. A. Torriani et al., (eds.), ASM, Washinton, DC, 49.

CURRENT STAGE OF PLANT NUTRITION MOLECULAR GENETICS

Wu Ping Luo Anchen Ni Qunjian Zhang Yongsong
(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Summary

In the past decade, techniques for understanding molecular mechanisms of nutrient-stress induced expression and for identifying and cloning genes underlying plant nutrition uptake and use efficiency provide the means for increasing understanding the molecular genetic background about plant nutrition. An attempt is made to discuss the current stage about strategies used to identify the genes for nutrient transporters, regulatory mechanisms induced by nutrient-stress and molecular marker techniques used in plant nutrition molecular genetics.

Key Words Plant nutrition Molecular genetics Current stage