

## 玉米 *ZmPHO2* 基因家族克隆 及其低磷胁迫下的表达

田跃辉, 吴玲, 刘丹, 张素芝, 聂治, 张啸, 苏顺宗, 罗博文, 高世斌\*

(四川农业大学 玉米研究所, 成都 611130)

**摘要:** *PHO2* (编码一个泛素结合酶 E2) 作为磷高亲和转运体 PHT1 的负调控子, 在维持植物体内磷的动态平衡中发挥重要作用。该研究以拟南芥和水稻中的 *PHO2* 为基础, 从玉米自交系 B73 基因组中鉴定出 9 个 *ZmPHO2* 基因家族成员, 在系统进化关系上将其分为 3 类。在玉米自交系 178 中克隆了上述 9 个基因的 CDS 全长序列, 保守结构域分析发现, *ZmPHO2* 蛋白质序列中均有 1 个由约 130 个氨基酸组成的泛素结合酶 E2 催化结构域 (UBCc), 其中包含 1 个重要的保守氨基酸 (半胱氨酸)。实时荧光定量结果表明, 低磷胁迫处理后, 所有 *ZmPHO2* 基因均有表达, 并呈现不同的表达模式, 主要表现为叶与根之间的组织差异和玉米自交系 178 与 9782 之间的基因型差异, 而在同一组织多数基因间的表达差异不明显。其中, *ZmPHO2; H2* 在自交系 9782 的根中持续下调表达, 但在叶中持续上调表达, 表明 *ZmPHO2; H2* 可能参与调控磷素在叶与根之间的运输, 以维持地上部分和地下部分磷的平衡。

**关键词:** 玉米; *ZmPHO2* 基因家族; 低磷胁迫; 定量分析

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Cloning and Expression of *ZmPHO2* Gene Family Members under Low Phosphate Stress in Maize

TIAN Yuehui, WU Ling, LIU Dan, ZHANG Suzhi, NIE Zhi, ZHANG Xiao,  
SU Shunzong, LUO Bowen, GAO Shibin\*

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** *PHO2* (encoding a ubiquitin-conjugating E2 enzyme), a negative regulator of phosphate transporter PHT1, is known to play a key role in the maintenance of phosphate homeostasis. In this study, nine members of *ZmPHO2* gene family were identified from whole genome sequence of maize inbred line B73 based on *PHO2* orthologs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, which can be subdivided into at least three clusters based on phylogenetic relationship among several plants. The complete CDSs of all *PHO2* homologs have been cloned from maize inbred line 178, and the conserved domain analysis revealed that all proteins have the same topology and harbor an ubiquitin-conjugating E2 enzyme catalytic domain (UBCc) which is fabricated of about 130 amino acids residues including a conserved cysteine. Based on quantitative real-time PCR, the transcripts of all *ZmPHO2* genes were detected and exhibited different expression profiles in different organs and genotypes under low phosphate stress, but there are no distinct expression profiles among most of genes in the same tissue. Among them, *ZmPHO2; H2* showed decreased expression

收稿日期: 2014-03-31; 修改稿收到日期: 2014-06-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31361140364, 31171566); 948 计划 (2011-G15-2, 2013-Z38)

作者简介: 田跃辉 (1988-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事玉米耐低磷机制方面的研究。E-mail: yuehuit@163.com

\* 通信作者: 高世斌, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事玉米遗传育种及逆境性分子生物学的研究。E-mail: shibingao@163.com

levels in roots and increased expression levels in leaves at all sampled time points in maize inbred line 9782, indicating that *ZmPHO2;H2* in maize may be involved in the regulation of phosphate transport from leaves to roots in order to maintain phosphorus homeostasis between the shoot and the root.

**Key words:** maize; *ZmPHO2* gene family; low phosphate stress; gene expression

磷是植物体内核酸、磷脂和 ATP 的重要组成部分,并作为植物体内能量转移物质,能够活化体内蛋白质,调控植物体整个代谢过程<sup>[1]</sup>。植物主要以无机磷(Pi)的形式吸收土壤中磷素。土壤对磷的强烈吸附使土壤溶液中植物可吸收的可溶性无机磷含量非常低,通常小于 10  $\mu\text{mol/L}$ 。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决定因素之一<sup>[2]</sup>。在低磷条件下,植物会通过自身对低磷胁迫信号通路作出应答,从而介导根系对介质中磷的吸收,以及磷在细胞、组织和器官中的转运,以维持植株体内磷素稳定与平衡<sup>[3]</sup>。

通过对模式植物磷利用相关转录因子 *PHR1*、*PHO2* 和 *PHF1* 等功能的研究,对植物磷信号途径及分子机制有了更多的认识<sup>[4]</sup>。其中,*PHO2*、*miR399*(*miR399*)家族和 *AtIPS/At4* 家族构成的信号通路在磷的吸收、转运中发挥着重要作用。Delhaize 等<sup>[5]</sup>从拟南芥中鉴定出了突变体 *pho2*,与野生型相比,*pho2* 根系中的磷没有变化,但叶片中磷含量增加 2~4 倍,茎秆、花序和种子中磷含量也有所增加。功能分析表明该基因产物是一个 E2 泛素结合酶(UBC)。在低磷处理的 *phr1* 拟南芥突变体中证实了 *miR399* 和 *PHO2* 是在磷信号通路 *PHR1* 的下游<sup>[6]</sup>。与野生型相比,*phr1* 突变体和过表达的 *AtPHR1*、*OsPHR2* 也会导致叶中磷含量积累,与 *miR399* 的过表达植株或是 *pho2* 突变体植株类似<sup>[7-8]</sup>。进一步研究表明 *AtPHO2* 上游存在重要调控因子 *microRNA399s*(*miR399s*),且两者共存于维管束中<sup>[9]</sup>。低磷处理下,*miR399* 上调表达,而 *AtPHO2* 基因下调表达,同时,在转基因植株中过表达 *miR399*,增强了磷的吸收和从根到叶中的转运,而从叶向根的运输被抑制,使磷元素在叶中大量积累,从而导致磷中毒的现象,与 *pho2* 突变体表型一致<sup>[10-11]</sup>。在 *AtPHO2* 的 5'-UTR 区域包括有 5 个约有 21 个核苷酸基序可以和拟南芥 *miR399s* 互补,其中,*miR399f* 对 *AtPHO2* 的抑制作用比 *miR399b*、*miR399c* 更明显<sup>[12]</sup>。此外,*AtPHO2* 在根中的表达受到叶中磷稳态和韧皮部中 *miR399* 的迁移系统调控<sup>[13-14]</sup>。同时有研究表明,在低磷条件下,由于上调 *miR399* 抑制了 *PHO2* 表达,*PHO1*

下调表达得到缓解,并且突变体 *pho2* 中 *PHO1* 表达量明显上调。烟草叶片中的瞬时表达系统表明了 *PHO1* 和 *PHO2* 蛋白在内质网膜上有生理水平上的相互作用。同时酵母双杂交系统进一步证实了 *PHO2* 介导的 *PHO1* 降解过程中,*PHO1* 的 N 末端起作用<sup>[15]</sup>。

目前在拟南芥和水稻中对 *PHO2* 相关基因功能有了较深认识,但对玉米中该基因克隆和组织特异性表达及胁迫应答模式仍不清楚。本研究首先选用拟南芥和水稻中 *PHO2* 基因氨基酸序列在玉米 B73 氨基酸序列库中进行本地化 Blastp 同源搜索,并将得到的氨基酸序列使用 Pfam 进行结构域分析,最终获得 *ZmPHO2;1*、*ZmPHO2;2* 以及 *ZmPHO2;H1* 等 9 个家族成员。通过同源克隆方法,在自交系 178 中得到 *ZmPHO2* 基因家族 CDS 全长序列,并通过实时荧光定量 PCR 方法检测其在 mRNA 水平上的时空表达特征,以初步探索它们在低磷胁迫下的表达变化规律,为深入探究玉米 *ZmPHO2* 基因在磷转运下游信号通路中的作用奠定基础,进而为玉米磷高效育种提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及处理

实验材料为玉米自交系 178 和 9782,由四川农业大学玉米研究所提供<sup>[16]</sup>。在三叶一心期选取整齐一致幼苗移进 Hoagland 全素营养液<sup>[17]</sup>,适应性培养 2 d,再设置低磷(1  $\mu\text{mol/L}$ )和正常磷(1 mmol/L)2 个供磷水平分别进行培养,每 2 d 换 1 次营养液。每天光照 12 h,通气 12 h,温度保持在 25  $^{\circ}\text{C}$ ~28  $^{\circ}\text{C}$ 。分别在正常磷浓度(对照)处理 0 h,低磷处理 6、12、24、48、72 和 96 h 时,取玉米自交系 178 和 9782 幼苗根系和叶片约 0.5 g(3 株混合取样),液氮研磨成粉末,用 Trizol 试剂完全溶解,并于 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

RNA 操作中的各种溶液均采用 RNAase free water 配制。用 Trizol 法提取不同处理自交系叶和根的总 RNA,用适量 RNase-free 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解 RNA,取 2  $\mu\text{L}$  充分溶解的总 RNA,稀释 10 倍后,

NanoDrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪检测其浓度和纯度。凝胶成像系统照相鉴定 RNA 完整性,然后按照宝生物公司 (TaKaRa) 试剂盒 Prime-Script® RT reagent Kit (Perfect Real Time) 中的反转录反应试剂 (TaKaRa Code: DRR037S) 将总 RNA 反转录成 cDNA, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.3 玉米 *ZmPHO2* 基因家族的鉴定

以拟南芥和水稻 *PHO2* 基因 (At2g33770 和 LOC\_Os05g48390) 的氨基酸序列为模板,通过本地化 Blastp 程序在玉米 B73 的蛋白质数据库中进行同源搜索,筛选出玉米基因组中 *ZmPHO2* 候选基因<sup>[18]</sup>。将所得到的候选氨基酸序列在保守结构域 Pfam 数据库中进行比对,筛选出 *ZmPHO2* 基因家族的其余成员,并从 B73 基因组数据库中获得候选基因的序列信息。通过在线工具 Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 分析蛋白质的分子量和等电点。通过 ClustalX 和 MEGA 5.0 在玉米、拟南芥、水稻和大豆等 *PHO2* 基因的氨基酸序列中采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 进行系统进化树分析,并用 DNAMAN 进行该家族氨

基酸序列的多重比对分析。

### 1.4 *ZmPHO2* 基因克隆

根据上述获得基因的 cDNA 和 CDS 序列信息,用 Primer 5 设计 PCR 引物 (表 1),以玉米自交系 178 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增程序为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1~3 min, 32 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 获得完整的 CDS 全长序列。PCR 产物经凝胶回收后连接至 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 大连), 送 Invitrogen 测序。

### 1.5 *ZmPHO2* 家族成员在低磷胁迫下的表达分析

根据测序结果,用 Beacon Designer 设计荧光定量 PCR 引物 (表 2),以不同时间低磷胁迫处理的 cDNA 作为 qRT-PCR 模板,以玉米 *GAPDH* 为内参对照,采用 SsoFast EvaGreen Supermix (BIO-RAD), 利用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪进行实时荧光检测。反应程序为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,  $T_m$   $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行数据的相对定量分析,每个处理的时间段和对照时间段的样品均设 3 个重复。

表 1 *ZmPHO2* 基因全长扩增引物序列

Table 1 Primers used for cloning of *ZmPHO2* genes

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度 $T_m/^{\circ}\text{C}$
<i>ZmPHO2</i> ;1	ATGGATTTGTTTACAATTGACTC	TTACCGGTCGCTGGTGA	54.6
<i>ZmPHO2</i> ;2	ATGAATGAGGAACATAACAAT	CAAACACGTGATTTTGTCT	53.2
<i>ZmPHO2</i> ;H1	ATGGCTCTCAAGAAGTTGC	TCAACACGATTTTACGCTA	53.4
<i>ZmPHO2</i> ;H2	ATGTTCTGGCAGGGTACA	TCAGCTTTCTGTAACGGTT	55.4
<i>ZmPHO2</i> ;H3	ATGGAGGATGATTGTGATGA	TCAGGCGGCTGCAGGTTT	55.4
<i>ZmPHO2</i> ;H4	ATGGCGACCCGCGCCTC	TTACAGCCTCAACGTGGTGT	54.0
<i>ZmPHO2</i> ;H5	ATGAGTTACCTCTGCGCG	TTACAGCCTCAATGTGGTG	54.6
<i>ZmPHO2</i> ;H6	ATGAAAGTCTACCAAATG	TCAGCTCTCTAACGGG	53.2
<i>ZmPHO2</i> ;H7	ATGGACACCGAGTACCGC	TCAGGTGCCTGCAGGTTG	54.0

表 2 *ZmPHO2* 基因荧光定量引物序列

Table 2 QRT-PCR primers used for *ZmPHO2* genes

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度 $T_m/^{\circ}\text{C}$
<i>ZmPHO2</i> ;1	ACTGGAGCGAACAGTAAAT	TGACCTGATAACGACCTC	54.0
<i>ZmPHO2</i> ;2	TGTTCTTGAGATTACCAC	GGTCCCAGTATATGACTC	54.0
<i>ZmPHO2</i> ;H1	GCTCCTCTGTGAATGTC	TTCCTTGCTCTGTCTT	53.6
<i>ZmPHO2</i> ;H2	TGAAGTCACTAGAGATA	ATGTAACGAATAAGAGG	53.6
<i>ZmPHO2</i> ;H3	CGATGAGAAGTTGAAGAAG	CCACCAAGACCAGTTAT	53.6
<i>ZmPHO2</i> ;H4	TTGGGCGTTTAGGGACAC	ACAAGCTGAAGCTGAGGACG	54.8
<i>ZmPHO2</i> ;H5	CAAGAATAAGCAAAGTGT	AGTCATCAGAATAGTTGT	53.6
<i>ZmPHO2</i> ;H6	GCATACCTGAGAATAGCA	ATAGCATCCGAGTTTGAC	52.0
<i>ZmPHO2</i> ;H7	GCAGGCTCATTTGATACT	GGTCCTTCTCAACTTCTC	56.6
<i>GAPDH</i> (内参)	ACTTCGGCATTGTTGAGG	AAGTCGGTAGAAACCAGAT	56.0

## 2 结果与分析

### 2.1 *ZmPHO2* 基因家族及其序列特征分析

通过同源比对和氨基酸序列的分析,在玉米 B73 的基因组序列中鉴定出 2 个 *PHO2* 基因,分别命名为 *ZmPHO2;1*(序列号 GRMZM2G381709)和 *ZmPHO2;2*(序列号 GRMZM2G464572),并通过

在结构域 Pfam 数据库中比对鉴定出其余 7 个 *ZmPHO2* 基因家族成员,分别命名为 *ZmPHO2;H1*~*ZmPHO2;H7*。对其蛋白质序列进行分析,得到相应的氨基酸数目、等电点和分子量(表 3)。经保守结构域分析发现,该基因家族的氨基酸序列中存在 1 个泛素结合酶 E2 的催化结构域 UBCc(图 1),其中,半胱氨酸是重要保守氨基酸,为泛素结合酶复合

表 3 玉米自交系 B73 中 *ZmPHO2* 基因家族成员的蛋白特征

Table 3 Protein characteristics of *ZmPHO2* gene family members from maize inbred line B73

序列号 Accession number	基因名称 Proposed name	推测氨基酸 Putative amino acid			位置 Location
		长度 Length/aa	分子量 Molecular weight/kD	等电点 pI	
GRMZM2G381709	<i>ZmPHO2;1</i>	871	96.37	4.77	Chr6
GRMZM2G464572	<i>ZmPHO2;2</i>	871	96.37	4.74	Chr9
GRMZM2G010460	<i>ZmPHO2;H1</i>	373	41.39	8.39	Chr3
GRMZM2G086583	<i>ZmPHO2;H2</i>	267	38.36	6.83	Chr3
GRMZM2G123519	<i>ZmPHO2;H3</i>	384	43.51	4.91	Chr3
GRMZM2G085849	<i>ZmPHO2;H4</i>	507	56.87	5.61	Chr6
GRMZM2G027546	<i>ZmPHO2;H5</i>	520	58.37	5.42	Chr8
GRMZM2G078360	<i>ZmPHO2;H6</i>	1102	12.20	4.55	Chr8
GRMZM2G122003	<i>ZmPHO2;H7</i>	438	49.63	5.14	Chr8

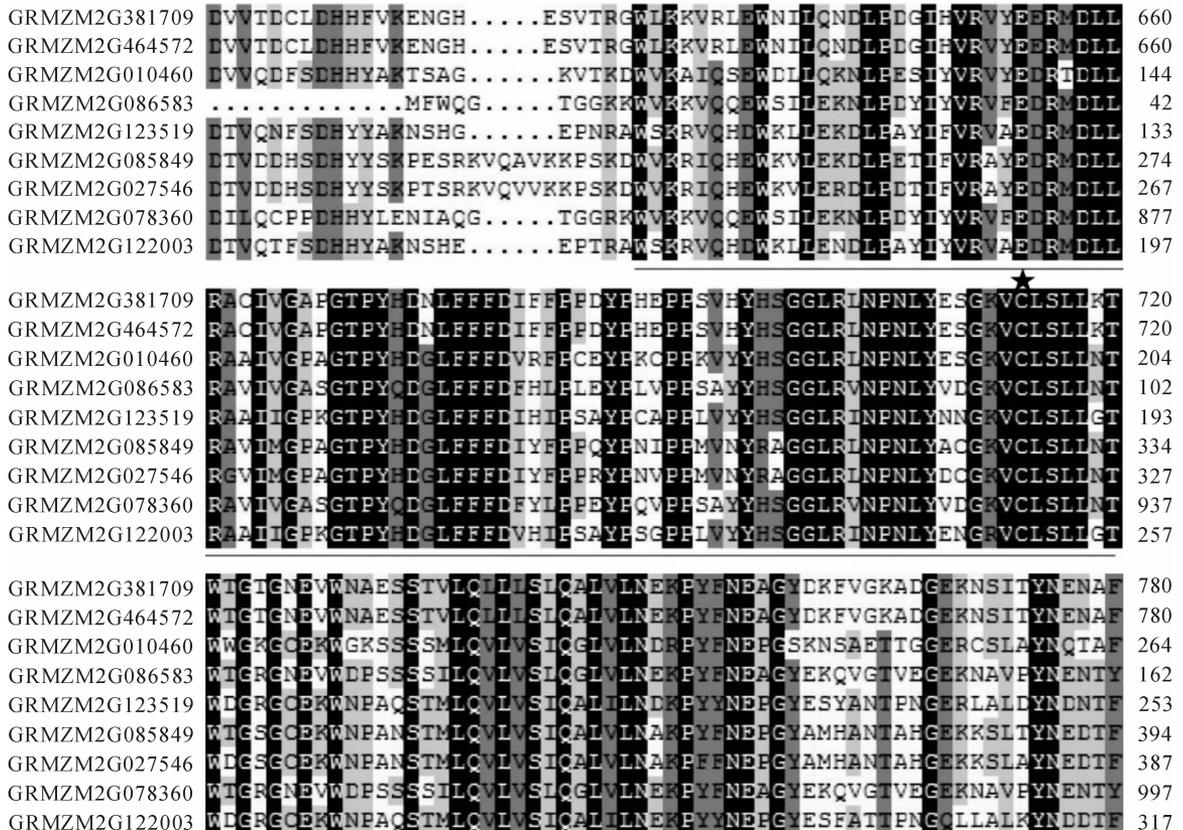


图 1 玉米 *ZmPHO2* 基因家族氨基酸序列比对

图中横线部分为 UBCc 保守功能域,星号处为各序列中的催化位点

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of *ZmPHO2* gene family in maize

The conservative function domain UBCc is underlined, and the asterisk indicates the catalytic site in these sequences

体的形成起到重要的活化作用。将玉米 PHO2 与拟南芥、水稻、大豆等植物的 PHO2 进行比对,并用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树(图 2)。从图中可以看出,该家族主要分为 3 个类群,其中 ZmPHO2;1、ZmPHO2;2 聚为一个类群,且与水稻、大麦和短柄草的 PHO2 亲缘关系最近, ZmPHO2;H2 和 ZmPHO2;H6 聚在第二分支,与拟南芥 PHO2 进化距离较近,其余则聚为第三类群。

2.2 ZmPHO2 基因克隆及突变位点分析

利用设计的 ZmPHO2 基因的 9 对引物,以自交系 178 苗期的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物大小和预期相符,并通过 DNASTAR 和 DNAMAN 对测序结果进行分析。结果表明,ZmPHO2 基因序列在自交系 178 和 B73 间存在碱基突变,并导致 ZmPHO2;H1、ZmPHO2;H4 和 ZmPHO2;H6 的氨基酸序列发生变化(表 4)。其中,在 ZmPHO2;H1 氨基酸序列的 UBCc 保守结构域内酪氨酸突变为半胱氨酸,而半胱氨酸在泛素结合酶复合体形成中起到非常关键的活化作用,这一变化是否与磷转运调控有关值得进一步研究。

2.3 ZmPHO2 家族成员的不同组织表达分析

为进一步分析 ZmPHO2 基因在玉米中的表达模式,选用 2 种玉米基因型自交系材料 178 和 9782 为研究对象。荧光定量结果表明,ZmPHO2 基因家族成员在低磷胁迫处理下均有表达,且呈现不同的表达模式,主要表现在不同基因型之间、叶与根组织之间的显著差异(图 3)。低磷胁迫处理下,ZmPHO2 基因在自交系 178 根和叶中上调表达的时段比自交系 9782 上调表达的时段多,其中,尤以

ZmPHO2;H2 和 ZmPHO2;H4 最为明显。此外,

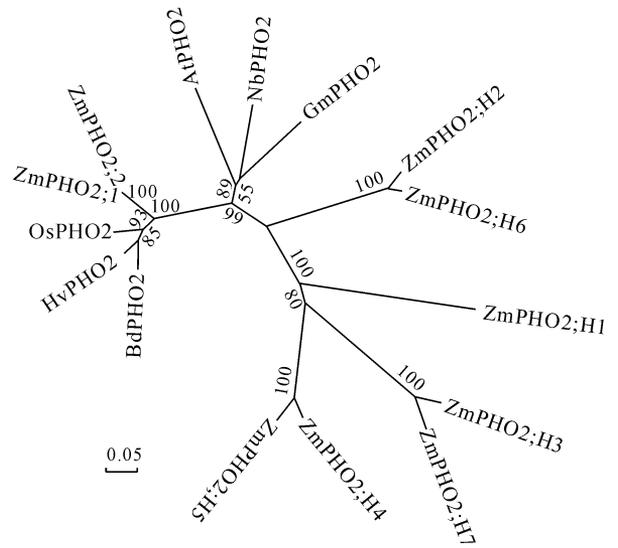


图 2 不同植物 PHO2 基因氨基酸序列的进化树分析  
图中分支点的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比;标尺代表遗传距离;选用的 PHO2 蛋白序列分别为拟南芥 PHO2(AT2G33770)、水稻 PHO2(Os05g48390)、大豆 PHO2(Glyma13g31290)、本氏烟 PHO2(EU375892)、大麦 PHO2(GQ861514)和短柄草 PHO2(Bradi2g16960)

Fig. 2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of ZmPHO2 genes from different plants  
The number on the branches represents the reliability percent of Bootstrap values based on 1000 replications; The scale bar represents genetic distance; Amino acid sequences of ZmPHO2 with homologs from other plants: *Arabidopsis thaliana* PHO2 (AT2G33770), *Oryza sativa* PHO2(Os05g48390), *Glycine max* PHO2(Glyma13g31290), *Nicotiana benthamiana* PHO2 (EU375892), *Hordeum vulgare* PHO2(GQ861514) and *Brachypodium distachyon* PHO2(Bradi2g16960)

表 4 ZmPHO2 家族基因在自交系 178 中的突变位点分析

Table 4 Analysis of mutant sites in members of ZmPHO2 gene family in maize inbred line 178

基因名称 Gene name	核苷酸、氨基酸突变位点 Mutant in nucleotide and amino acid sequences	
	B73	178
ZmPHO2;1	GAG(2196)谷氨酸 Glutamic acid	GAA(2196)谷氨酸 Glutamic acid
ZmPHO2;2	CTC(332)亮氨酸 Leucine; TCG(1682)丝氨酸 Serine; GAG(2196)谷氨酸 Glutamic acid	CTT(332)亮氨酸 Leucine; TCA(1682)丝氨酸 Serine; GAA(2196)谷氨酸 Glutamic acid
ZmPHO2;H1	TAC(398)酪氨酸 Tyrosine; TAC(1012)酪氨酸 Tyrosine	TGC(398)半胱氨酸 Tyrosine; CAC(1012)组氨酸 Histidine
ZmPHO2;H2	GCG(645)丙氨酸 Alanine	GCA(645)丙氨酸 Alanine
ZmPHO2;H3	无突变位点 No mutant	无突变位点 No mutant
ZmPHO2;H4	AGT(484)丝氨酸 Serine; CAT(552)组氨酸 Histidine; AAC(780)天门冬酰胺 Asparagine; TTC(1315)苯丙氨酸 Phenylalanine; TGG(1318)色氨酸 Tryptophane	GGT(484)甘氨酸 Glycine; CAG(552)谷氨酰胺 Glutamine; TAC(780)酪氨酸 Tyrosine; CTC(1315)亮氨酸 Leucine; CGG(1318)精氨酸 Arginine
ZmPHO2;H5	无突变位点 No mutant	无突变位点 No mutant
ZmPHO2;H6	GTT(1073)缬氨酸 Valine; AGG(1775)精氨酸 Arginine; ATA(2110)异亮氨酸 Isoleucine; GGA(2162)甘氨酸 Glycine; GAT(2371)天门冬氨酸 Aspartic acid	GCT(1073)丙氨酸 Alanine; AAG(1775)赖氨酸 Lysine; GTA(2110)缬氨酸 Valine; GAA(2162)谷氨酸 Glutamic acid; CAT(2371)组氨酸 Histidine
ZmPHO2;H7	无突变位点 No mutant	无突变位点 No mutant

*ZmPHO2*;H2 的表达变化特殊,在自交系 9782 的 叶中持续上调表达而根中均表现为下调,暗示该基

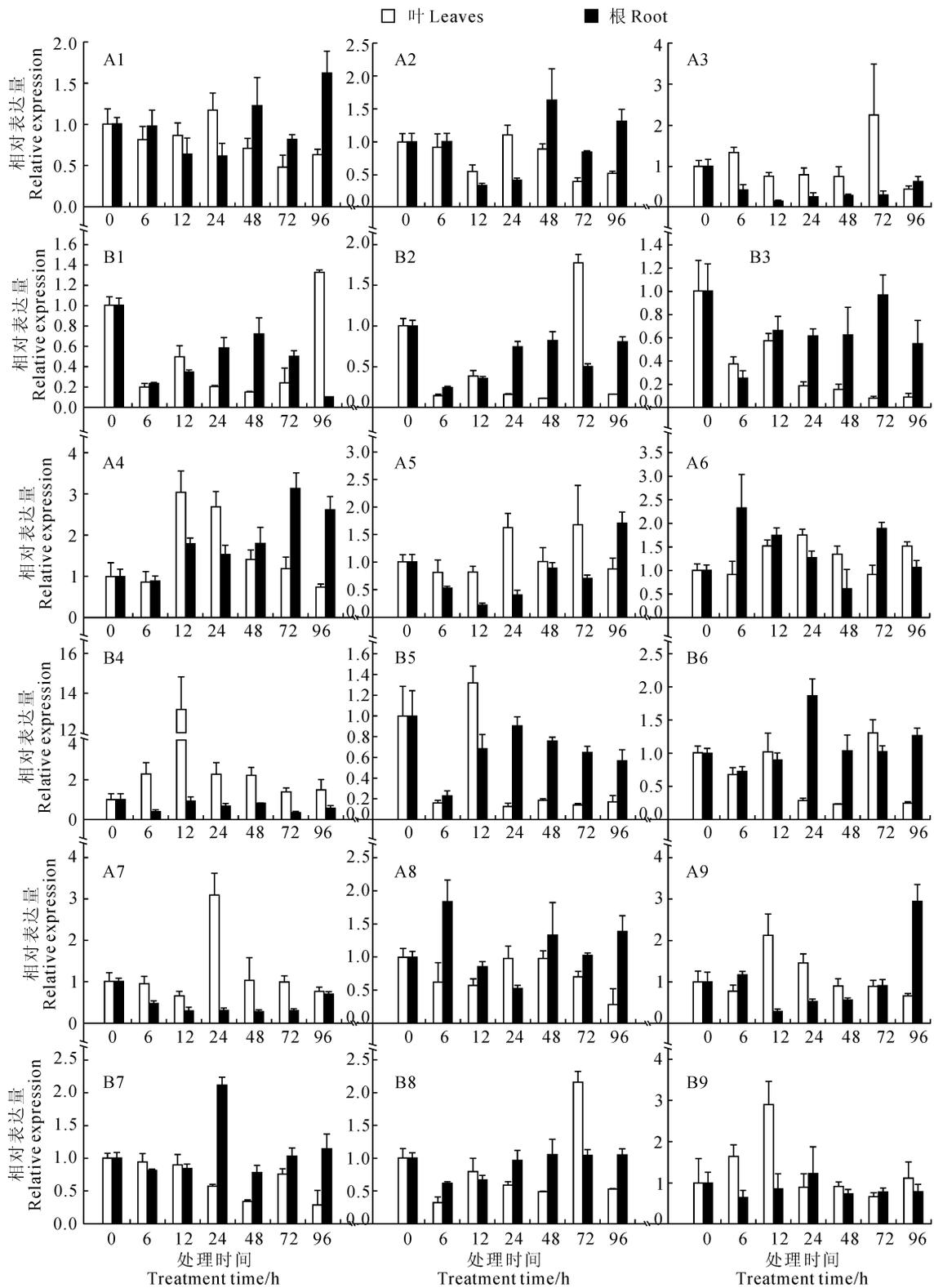


图 3 低磷胁迫下玉米自交系 178(A)和 9782(B)中 *ZmPHO2* 的表达

Fig. 3 The relative expression of *ZmPHO2* genes between maize inbred line 178(A) and

9782(B) treated by low-Pi stress for different times

- 1. *ZmPHO2*;1; 2. *ZmPHO2*;2; 3. *ZmPHO2*;H1; 4. *ZmPHO2*;H2; 5. *ZmPHO2*;H3;
- 6. *ZmPHO2*;H4; 7. *ZmPHO2*;H5; 8. *ZmPHO2*;H6; 9. *ZmPHO2*;H7

因在自交系 9782 的磷转运中发挥着特殊作用。

另外值得关注的是,低磷胁迫 24 和 96 h 时, *ZmPHO2* 基因在自交系 9782 的不同组织间的表达差异不大,且多数基因在叶或根中为下调表达。而在自交系 178 中, *ZmPHO2* 基因在叶和根中呈现相反的表达规律。其中,在低磷胁迫 24 h 时, *ZmPHO2;1* 和 *ZmPHO2;2* 等 7 个基因在叶中上调表达,其中的 *ZmPHO2;H5* 上调表达比对照高约 3 倍,而根中有包括 *ZmPHO2;1* 在内的 7 个基因表现为下调;在低磷胁迫 96 h,除 *ZmPHO2;H4* 在叶中仍上调表达外,其余 8 个基因均表现为下调表达,同时,在根中除 *ZmPHO2;H1* 和 *ZmPHO2;H5* 仍表现为下调外,其余 7 个基因均上调表达。

综上,自交系 9782 根和叶中下调时段居多,初步推测低磷胁迫下,根中吸收磷的能力增强而叶中向下运输磷的能力减弱,有利于磷在叶中的积累。在低磷胁迫 24 和 96 h,自交系 178 的叶和根表达规律相反,可能是应答低磷的关键时间段,在低磷胁迫初期(24 h), *ZmPHO2* 基因在叶中上调表达而根中下调,从而促进磷在根和叶之间的循环,有利于磷素在不同组织间的平衡;随着低磷胁迫时间延长至 96 h,叶中下调表达而根中上调,则有利于磷在叶中的积累。因此,进一步鉴定 *ZmPHO2* 基因家族成员应答低磷胁迫的功能和作用,可以加深理解玉米耐低磷胁迫的分子机制。

### 3 讨论

磷元素是核酸与磷脂的结构组成成分,是物质代谢和能量代谢的活化中间体,广泛参与植物体内的信号级联传导和生化合成等代谢过程。作为不可或缺的营养元素对作物产量和种质资源特性的保持起着重要作用,如何提高磷的利用率已成为一个研究热点。*PHO2* 序列含有特定的 1 个泛素结合酶 E2 催化(UBC<sub>c</sub>)结构域,参与泛素介导的蛋白降解途径。该途径中在保守的半胱氨酸和泛素 C 末端形成一个硫酯键,并和泛素连接酶 E3 形成复合体,在细胞内选择性降解蛋白中起到重要作用,同时广泛参与植物生长发育相关过程<sup>[19]</sup>。近年来 E2 蛋白在植物抗逆胁迫相关的功能逐渐被揭示,蛋白的泛素化在植物低磷胁迫的信号转导中起到重要作用<sup>[20]</sup>。在水稻<sup>[6]</sup>和拟南芥<sup>[9]</sup>中已报道 *PHO2* 基因参与调控叶和根间的磷转运,以维持地上部分和地下部分间磷素的动态平衡。因此,分离和鉴定玉米中的 *PHO2* 基因家族成员,进一步了解其低磷响应

分子机制,从而为玉米磷高效分子育种提供优良的候选基因。

利用比较基因组学的研究手段,本研究在玉米基因组中筛选得到 9 个 *PHO2* 基因家族成员,并从自交系 178 中分离得到所有家族成员的 CDS 全长序列。通过比对分析发现, *ZmPHO2;H1*、*ZmPHO2;H4* 和 *ZmPHO2;H6* 序列均发生突变并导致保守结构域氨基酸序列中也发生变化。其中, *ZmPHO2;H1* 的氨基酸突变发生在结构域内部,由酪氨酸变为半胱氨酸,而半胱氨酸在泛素结合酶复合体形成中起到非常关键的活化作用。因此,上述基因催化结构域 UBC<sub>c</sub> 内部氨基酸的突变是否会影响到该蛋白在后续磷转运上的功能,需要进一步对该基因进行功能验证。通过对野生型拟南芥和 *pho2* 突变体根细胞膜内蛋白质组学分析,发现了 *PHO2* 下游受到其负调控的蛋白为 PHT1 基因家族成员(PHT1;1, PHT1;2, PHT1;3, PHT1;4)和 PHF1<sup>[21]</sup>,并且 *PHO2* 通过蛋白泛素化机制直接在内质网膜系统降解 PHT1s,并与细胞膜系统的 NLA 调控因子相互作用促使质膜上的 PHT1s 泛素化,从而证实了 *PHO2* 基因在细胞内介导泛素化的关键作用<sup>[22]</sup>。

有研究报道指出,在低磷转运途径中,根和叶中磷响应的分子机制可能会不同<sup>[23]</sup>,本研究定量结果证实了部分家族成员在低磷胁迫 24 和 96 h,自交系 178 的根和叶中表达量变化呈现相反的趋势,而自交系 9782 的叶和根中则呈现出了相似的表达特征。这种不同基因型组织间的差异与磷利用效率有一定的关联,从上述两个低磷处理的时间段分析得到,该家族基因表达特征利于自交系 178 根和叶间磷的平衡,而在自交系 9782 的叶中磷得到一定程度的积累。同时,低磷胁迫 12 h 内,两种自交系的 *ZmPHO2* 家族成员在根中总体表现为下调表达,推测该基因上游存在重要调控因子抑制 *ZmPHO2* 基因的表达,从而有利于积累根部的 PHT1s 等重要的磷转运蛋白,促进磷的吸收。另外,低磷胁迫 96 h 时,在自交系 178 叶和根中, *ZmPHO2;H1* 基因均为下调表达,且在自交系 9782 根和叶中所有时段均表现为下调,可能被抑制表达的时间比其它基因长,利于根部磷的吸收和叶中磷的积累。值得关注的是, *ZmPHO2;H2* 在自交系 9782 的根和叶中表达模式明显不同,在根中持续下调表达有利于根对磷的吸收,而在叶中的上调表达促使磷从叶向根的转运,因此,该基因有可能在维持地上部分和地下部分

磷素的平衡中起到重要作用。然而,在植物组织间的信号转导途径尚待进一步研究,*ZmPHO2* 家族成员在两种基因型自交系中的表达规律也将为进一步

探索和揭示 *PHO2* 基因在低磷响应长距离运输机制中的作用奠定基础。

### 参考文献:

- [1] MARSCHNER H. Mineral Nutrition of Higher Plants[M]. London: Academic Press, 1995: 889.
- [2] SCHACHTMAN D P, REID R J, AYLING S M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell[J]. *Plant Physiology*, 1980, **116**(2): 2 447–2 453.
- [3] VANCE C P, UHDE-STONE C, ALLAN D L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptation by plants for securing a nonrenewable resource[J]. *New Phytologist*, 2003, **157**(3): 423–447.
- [4] CHIOU T J, LIN S I. Signaling network in sensing phosphate availability in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, **62**: 185–206.
- [5] DELHAIZE E, RANDALL P J. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1995, **107**(1): 207–211.
- [6] BAJENDRA B, PANT B D, STITT M, et al. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants[J]. *Plant Physiology*, 2006, **141**(3): 988–999.
- [7] NILSSON L, MULLER R, NIELSEN T H, et al. Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2007, **30**(12): 1 499–1 512.
- [8] LENIN S C, JOSÉ L B, ALEJANDRA C L, et al. Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency[J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(3): 879–889.
- [9] AUNG K, LIN S I, WU C C, et al. Pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a MicroRNA399 target gene[J]. *Plant Physiology*, 2006, **141**(3): 1 000–1 011.
- [10] CHIOU T J, AUNG K, LIN S I, et al. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(2): 412–421.
- [11] FUJII H, CHIOU T J, LIN S I, et al. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2005, **15**(22): 2 038–2 043.
- [12] LIN S I, CHIANG S F, LIN W Y, et al. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling[J]. *Plant Physiology*, 2008, **147**(2): 732–746.
- [13] BUHTZ A, SPRINGER F, CHAPPELL L, et al. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus* [J]. *The Plant Journal*, 2008, **53**(5): 739–749.
- [14] PANT B D, BUHTZ A, KEHR J, et al. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis[J]. *The Plant Journal*, 2008, **53**(5): 731–738.
- [15] LIU T Y, HUANG T K, TSENG C Y, et al. PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(5): 2 168–2 183.
- [16] ZHANG J H(张吉海), GAO SH B(高世斌), YANG K CH(杨克诚), et al. Screening and identification for tolerance to low phosphorus stress of maize germplasm resources[J]. *Journal of Plant Genetic Resources(植物遗传资源学报)*, 2008, **9**(3): 335–339(in Chinese).
- [17] CHEN S B, TAO L Z, ZENG L R, et al. A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, **7**(5): 417–427.
- [18] WANG Y, RIBOT C, REZZONICO E, et al. Structure and expression profile of the *Arabidopsis* PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis[J]. *Plant Physiology*, 2004, **135**(1): 400–411.
- [19] WANG J L, SHI S Q, JIA L Q, et al. Progress on functions of ubiquitin-conjugating enzyme(E2) in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, **4**: 7–10.
- [20] LIN W Y, LIN S I, CHIOU T J, et al. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**(5): 1 427–1 438.
- [21] HUANG T K, HAN C L, LIN S I, et al. Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots[J]. *The Plant Cell*, 2013, **25**(10): 4 044–4 060.
- [22] WEI Y L, HUANG T K, CHIOU T J. NITROGEN LIMITATION ADAPTATION, a target of MicroRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, **25**(10): 4 061–4 074.
- [23] FANG Z Y, SHAO C, MENG Y J, et al. Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*[J]. *Plant Science*, 2009, **176**(2): 170–180.