

引用格式: 席源, 张梅娟, 李莎莎, 等. 水稻 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因的功能鉴定及其对烟草耐低磷胁迫的影响[J]. 西北植物学报, 2024, 44(5): 0716-0728. [XI Y, ZHANG M J, LI S S, et al. Functional identification of the *OsMGD2* and *OsMGD3* genes in rice and their influence on phosphorus deficiency in tobacco[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(5): 0716-0728.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20230724

水稻 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因的功能鉴定及其对烟草耐低磷胁迫的影响

席源¹, 张梅娟², 李莎莎¹, 王灵龙³, 殷俐娜^{1,4}, 王仕稳^{1,4*}

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西杨凌 712100; 2 商洛学院 生物医药与食品工程学院, 陕西商洛 726000; 3 西北农林科技大学 农学院, 陕西杨凌 712100; 4 中国科学院 水利部 水土保持研究所, 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要 【目的】单半乳糖甘油二酯合酶(MGD)是合成单半乳糖甘油二酯(MGDG)的关键酶, 在植物响应低磷胁迫过程中起着重要作用。为系统了解水稻 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因在低磷胁迫响应中的作用和功能。【方法】用盆栽试验分析正常和低磷条件下野生型(SR1)、过表达 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因烟草的生理响应及脂质组分的变化。【结果】无论在正常还是低磷条件下, 转基因与野生型烟草的磷含量无显著差异, 但转基因烟草的生物量、叶绿素含量和光合能力均显著高于野生型。转基因烟草在低磷胁迫下的磷脂(PL)含量、双半乳糖甘油二酯(DGDG)含量、DGDG与MGDG的比值和半乳糖脂(GL)与PL的比值均显著高于野生型烟草, 且 *OsMGD3* 转基因烟草的脂质含量和比值均高于 *OsMGD2* 转基因烟草。【结论】通过调控水稻 *OsMGD2/3* 基因表达, 可提高植物低磷下的膜脂重塑能力, 进而维持植物在低磷胁迫下较高的光合和生长能力, 增加植物的低磷耐受性。

关键词 水稻; 低磷胁迫; 转基因烟草; 膜脂重塑; 单半乳糖甘油二酯合酶; 单半乳糖甘油二酯; 双半乳糖甘油二酯; 磷脂

中图分类号 Q945.78; S511 文献标志码 A

Functional identification of the *OsMGD2* and *OsMGD3* genes in rice and their influence on phosphorus deficiency in tobacco

XI Yuan¹, ZHANG Meijuan², LI Shasha¹, WANG Linglong³, YIN Lina^{1,4}, WANG Shiwen^{1,4*}

(1 College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 School of Biomedical and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, China; 3 College of Agricultural, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on the loess Plateau, Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences, Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract [Objective] Monogalactose diglyceride synthase (MGD) is a key enzyme in the synthesis of monogalactose diglyceride (MGDG) and plays an important role in plant response to low phosphorus tolerance. We aim to understand the role of the *OsMGD2* and *OsMGD3* genes of rice in response to phosphorus (P) deficiency. [Methods] A pot experiment was conducted to analyze physiological responses and lipid

收稿日期: 2023-11-14; 修改稿收到日期: 2023-12-20

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2021JM-604)

作者简介: 席源(1999-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗逆生理研究。E-mail: xy1204930009@163.com

* 通信作者: 王仕稳, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物生理生态和植物营养等研究。E-mail: shiwenwang@nwsuaf.edu.cn

composition changes of the wild-type (SR1) and transgenic tobacco under normal and low P condition. [Results] There was no difference in P content between the transgenic and wild-type tobacco under normal and P deficiency conditions. However, the biomass, chlorophyll content, and photosynthetic electronic transfer of the transgenic tobacco were higher than wild-type. The phospholipid (PL) content, digalactose diglyceride (DGDG) content, DGDG/MGDG ratio, and GL/PL ratio of the transgenic tobacco were higher than those of the wild-type tobacco under low phosphorus deficiency, and the lipid content and ratio of the tobacco expressing *OsMGD3* were higher than the tobacco expressing *OsMGD2*. [Conclusion] Regulation of *OsMGD2/3* gene expression in rice can improve lipid remodeling ability and maintain higher photosynthetic and growth capacity under phosphorus deficiency, increasing plant tolerance to low phosphorus stress. **Key words** rice; phosphorus deficiency; transgenic tobacco; membrane lipid remodeling; MGD; MGDG; DGDG; phospholipid

磷(phosphorus,P)作为核酸、磷脂和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)的重要组成部分,在植物光合作用、呼吸作用以及核酸合成的过程中起关键作用^[1]。但土壤中可供植物直接吸收利用的无机磷含量极低,仅为 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$,远低于植物最佳生长浓度,严重限制作物的生长和产量的提升^[2]。在现代农业系统中,主要通过增施不可再生的磷酸盐肥改善植物磷缺乏状况。但由于施入土壤中的磷具有极高的反应性,在酸性土壤中,磷与铝(Al)和铁(Fe)易形成难溶的磷酸铁和磷酸铝,而在碱性土壤中,其与钙(Ca)和镁(Mg)易结合形成微溶性磷酸盐化合物,因此,施入土壤中的磷仅能在极小的 pH 范围内发挥作用,供植物吸收^[3]。然而据估测,自然界中的磷矿储量将在未来 100~200 年内耗尽,这将对未来的粮食生产构成严重威胁^[2,4]。因此,探明植物提高磷获取和磷利用效率的相关机制,减少植物对磷肥依赖,对提高作物产量和保障粮食安全至关重要。

单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol,MGDG)和双半乳糖甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol,DGDG)是高等植物类囊体膜的重要组成部分,约占类囊体膜脂的 80%,对植物的光合作用至关重要^[5-6]。其中,MGDG 分子因含有较小头部基团和高含量不饱和脂肪酸的尾部而呈圆锥形,易形成非双层结构,而 DGDG 分子的头部含有 2 个半乳糖残基,呈圆柱形,在水溶液中倾向于形成双层结构^[7]。研究表明,低磷条件下,植物的膜脂组分会发生改变。一方面,膜系统中的磷脂(phospholipid,PL)会被水解释放无机磷,以维持植物正常生命活动;另一方面,磷脂水解释放的甘油二酯(diacylglycerol,DAG)作为合成糖脂的底物,有利于半乳糖脂(galactolipid,GL)等的生物合成。所合成的半乳糖脂,尤其是 DGDG,可以替代损失的磷脂来维持膜的结构和功能,这一过程被称为“膜脂重塑”^[8-10]。

由此可见,提高半乳糖脂的生物合成可能有利于维持在低磷胁迫下植物膜结构的稳定性以及无机磷的浓度,维持各种代谢活动,并提高植物对低磷胁迫的耐受性。

在高等植物中,MGDG 的合成是由 MGDG 合酶(MGD)催化完成的,而 MGDG 又作为 DGDG 合成的底物,在 DGDG 合酶(DGD)的催化下合成 DGDG。由此可见,MGD 是合成 MGDG 和 DGDG 的关键酶。目前,人们已经在拟南芥中鉴定出 3 个与 MGDG 合成有关的基因:*AtMGD1*、*AtMGD2* 和 *AtMGD3*,并将其分为 Type A(*MGD1*)和 Type B(*MGD2* 和 *MGD3*)2 种类型^[9]。研究发现 Type A 型 *AtMGD1* 在植物体中广泛表达,主要负责催化绿色组织中 MGDG 的大量合成^[11]。如 *MGD1* 功能缺失的拟南芥突变体的叶绿素含量大幅下降^[12];玉米 *MGD1* 功能的丧失则会导致其叶片呈淡绿色表型,叶绿体超微结构产生缺陷、光合膜受损及光合能力下降^[13]。而 Type B 型 *AtMGD2* 和 *AtMGD3* 基因分别在非光合器官的花和根中大量表达,且在缺磷条件下表达量上升,这表明 TypeB 型 MGD 酶对低磷胁迫下 DGDG 的合成是必需的^[9,14-15]。陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)*GhMGD2* 基因在低磷胁迫下的表达量约为正常磷条件下表达量的 300 倍^[16]。低磷胁迫下,拟南芥 *mgd2-mgd3* 双突变体中 DGDG 的积累几乎完全消除,使糖脂无法替代磷脂,降低了植物对低磷胁迫的耐受性^[9]。在 *dgd1* 拟南芥突变体中,正常磷条件下的 DGDG 含量比野生型低 90%,而在低磷条件下,拟南芥中 DGDG 含量增加至野生型的 60%,表明 DGDG 对响应低磷胁迫有重要作用^[15]。由此可见,MGDG 和 DGDG 对植物的生长发育以及应对不同环境胁迫具有重要作用,而调控其生物合成可能有利于提高植物耐低磷胁迫能力。

为明确 Type B 型 MGD 基因对低磷胁迫的响应

及其功能,笔者克隆了水稻的 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因并转化至烟草中。结果表明,调控 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因的表达有利于维持植物膜系统的结构和功能,进而提高植物耐低磷胁迫的能力。

1 材料和方法

1.1 水稻 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因低磷下表达模式分析

将水稻种子消毒并置于 28 °C 培养箱中萌发。1 周后,将大小一致的水稻幼苗移至 1/2 营养液中进行水培,水稻营养液参照国际水稻研究所标准配方配制。持续通气,每 3 d 换 1 次营养液,每天调 pH 至 5.0,生长温度为 28 °C,光照强度为 600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期为 14 h/10 h。2 周后,取长势一致的水稻幼苗进行低磷胁迫处理。正常磷和低磷处理的营养液 P 浓度分别为 0.27 mmol/L 和 0 mmol/L,分别在处理第 0 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 和 7 d,取其第 1 片完全展开叶为试验材料。用 Qiagen 公司的 RNeasy Plant Mini kit 试剂盒提取水稻叶片和根的总 RNA,具体操作方法参照试剂盒说明书。反转录得到 cDNA,以 *OsUbq* 基因为内参调节各个样品的 cDNA 浓度,使其表达量一致后进行目的基因 RT-PCR 鉴定。内参基因及目的基因引物见表 1,PCR 循环数均为 28 个循环。

表 1 研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	用途 Application
<i>OsMGD2</i> -F	ATGCAACACATTCTCTATGGGTACTCAA	基因表达分析 Analysis of gene expression
<i>OsMGD2</i> -R	GGAGAAGACACCAGCACCATT	
<i>OsMGD3</i> -F	ACACCTGCCACCCGACA	
<i>OsMGD2</i> -R	GGTGAACCATCTGGCAACCTGTCT	
<i>OsUbq</i> -F	CACCCTGGCTGACTACAACA	内参基因 Reference gene
<i>OsUbq</i> -R	TTCTTCTTGCGGCAGTTGAC	
<i>NtACT</i> -F	CTGGCATTGCAGATCGTATGA	
<i>NtACT</i> -R	CTGGCATTGCAGATCGTATGA	
<i>OsMGD2</i> -F	GGAAGTTGGCAATGTCCCTTAT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>OsMGD2</i> -R	GCAACAAGTTTAGCAGTTTCCC	
<i>OsMGD3</i> -F	GTCATCTGTGGCAGGAACCA	
<i>OsMGD2</i> -R	GTACCAGGACCAGCCTTTGT	

1.3 培养条件及低磷处理

将转基因和野生型烟草(SR1)种子在超净工作台中用质量分数为 1% 的次氯酸钠溶液消毒 25 min 后,用无菌水清洗 4 遍,于 4 °C 黑暗环境过夜。次日将该种子播种在 pH 值为 5.6 且含 25 mg/L 潮霉素(用以筛选假阳性)的 1/4 MS 培养基中。将其存放

1.2 过表达 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因株系获得与鉴定

用拟南芥 Type B 型 *MGD2* 和 *MGD3* 的基因序列(At4g31780; At5g20410)在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索获得 *OsMGD2* (LOC_Os02g55910) 和 *OsMGD3* (LOC_Os08g20420) 基因序列。用特异性引物 5'-ATG-GCGGCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGT-3' 和 5'-TC-ACATAAGTTGTATAGGTGTGGTTTCTG-3' 及 5'-ATGGTGATCTCGGTCGCCACCCCGCC-3' 和 5'-TCATATGCTGTATGAGAACGATGAGGTC-3' 通过保真酶 Prime STAR Max Mix 扩增获得基因全长(引物由上海生工生物工程股份有限公司合成)。用 Gateway 法分别构建 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因的植物表达载体。以热激法将 2 个基因的重组质粒转化农杆菌 C58C1,并通过农杆菌介导转化野生型烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1),用潮霉素筛选,DNA 和 RNA 水平检测,各获得 3 个过表达烟草株系,即 *OsMGD2* 过表达烟草 2-06、2-16 和 2-18,*OsMGD3* 过表达烟草 3-04、3-08 和 3-21,进行后续试验。其中 RNA 水平检测采用实时荧光定量法(qRT-PCR, LightCycler480 System),以烟草 *NtActin* 基因为内参,各基因表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算^[17],引物序列见表 1。

于组培间避光培养 4~5 d,待幼根长至 3 mm,倾斜 45°置于光下培养 4 周,选择长势一致的幼苗分别在正常磷 NP(P 含量为 250 mg/kg)和低磷 LP(P 含量为 2.5 mg/kg)条件下进行盆栽试验,所用土壤为陕西杨凌当地黄绵土,移栽前向土壤中施加氮肥(NH₄NO₃)和钾肥(K₂SO₄)。使土壤 N 含量为 125

mg/kg, K 含量为 375 mg/kg, 每个处理重复 8 次。培养条件为光照 14 h/黑暗 10 h, 温度 25 °C, 湿度为 50% 左右。移栽后低磷处理 21 d 进行样品采集和光合指标测定。

1.4 烟草地上部生物量和磷含量测定

低磷处理 21 d 后, 取烟草地上部组织, 称取其质量即为鲜质量。将称完后的烟草置于烘箱中 105 °C 杀青 30 min 后, 75 °C 烘干至恒重, 每个处理重复 5 次。

磷含量测定用钒钼黄比色法^[18], 用紫外分光光度计(岛津 UV-2550)测定 440 nm 吸光度, 同时制作标准曲线, 得到磷含量。

1.5 叶绿素含量、叶片净光合速率和叶片荧光参数测定

参照高俊凤^[19]的方法, 用丙酮比色法测定叶绿素含量。用 Li-6400 便携式光合仪(LiCOR Inc, Lincoln, NE, USA)测定第 2 片完全展开叶的光合速率, 每个处理重复 5 次。

用 Imaging-PAM 荧光仪(Walz, Effeltrich Germany)测定叶绿素荧光动力学参数, 参考张梅娟^[20]的方法, 每个处理重复测定 5 次。

1.6 脂质分离和测定

参考 Wewer 等^[21]的方法进行脂质提取, 用薄层色谱法(TLC)进行脂质分离, 气相色谱法测定脂

质成分及含量。根据 Chen 等^[22]的方法计算不饱和脂肪酸双键指数(double bond index, DBI), 每个处理重复 3 次, 计算平均值。

1.7 数据处理

用 SPSS 21.0 软件分析试验数据, 用邓肯氏新复极差法在 $P < 0.05$ 水平下分析各组之间的差异显著性。用 Origin 2023 绘图。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsMGD* 基因在低磷胁迫下的表达模式研究

在低磷处理 0 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 和 7 d 后探究 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 的表达模式, 如图 1 所示, 无论在根还是叶中, *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 的表达量在低磷条件下均呈先增加后减少的趋势。*OsMGD2* 在水稻叶中的表达先增加后降低, 其中第 3 天最高(图 1, A); 而在水稻根中, 随着低磷处理的时间增加, *OsMGD2* 表达量逐渐增强, 第 5 天时达到最高(图 1, B)。*OsMGD3* 的叶和根在处理 1 d 以后开始增加, 低磷处理至 5 d 时表达量最高, 低磷处理至 7 d 时表达量下降。这表明, *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 基因在低磷胁迫下的叶和根中均被诱导表达, 且在第 3—5 天时表达量达到最高。

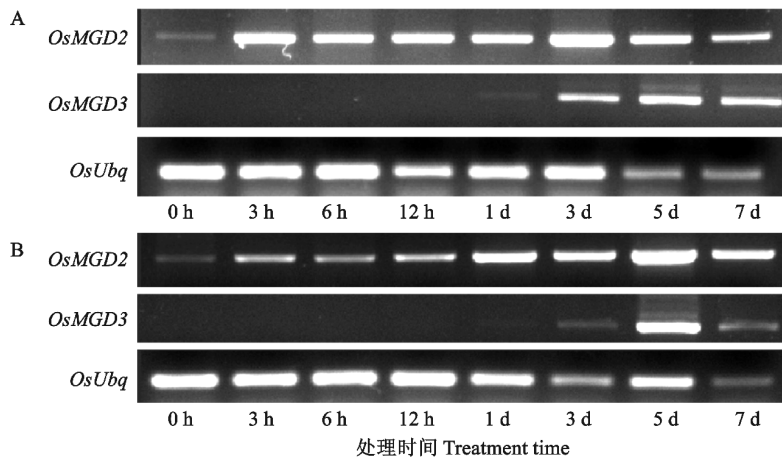


图 1 水稻 *OsMGD2/3* 基因在叶片(A)和根(B)中不同低磷胁迫时间的半定量 RT-PCR 鉴定
Fig. 1 Identification of the rice *OsMGD2/3* genes by semi-quantitative RT-PCR in leaves (A) and roots (B) under phosphorus deficiency

2.2 转基因烟草的筛选与鉴定

如图 2 所示, 通过基因组 DNA 分析筛选出 5 株 *OsMGD2* 转基因株系(图 2, A)和 12 株 *OsMGD3* 转基因株系(图 2, B)。进一步通过 qRT-PCR 分析各转基因株系中相关基因的表达量, 如图 2, C、D 所示, 从中各选 3 株表达量较高的作为后续试验材料, 分别是 *OsMGD2* 的 2-06、2-16 和 2-18, 以及 *OsMGD3* 的 3-

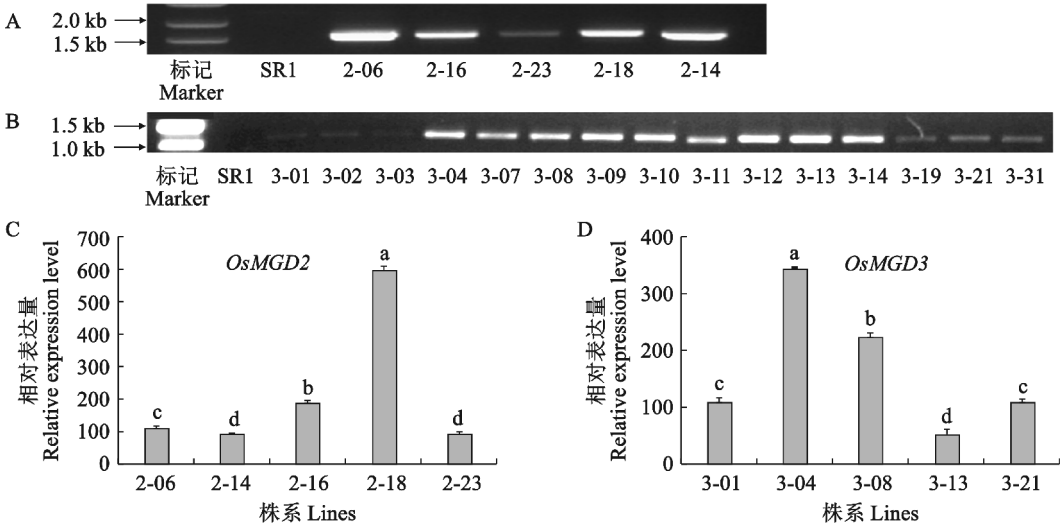
04、3-18 和 3-21。

2.3 过表达 *OsMGD2/3* 基因对低磷胁迫下烟草生长的影响

由(图 3, A—C)可知, 低磷胁迫下的 *OsMGD2/3* 转基因烟草老叶的坏死斑点数和面积明显少于野生型烟草 SR1。在正常磷水平下, *OsMGD3* 转基因烟草的地上部生物量显著高于野生型, 而 *OsMGD2*

的转基因株系中仅 2-18 的地上部每株生物量显著高于野生型(图 3,D)。低磷处理后, *OsMGD2* 的 2-18 以及 *OsMGD3* 的 3 个转基因株系的生物量均显

著高于野生型烟草, 表明调控 *OsMGD2/3* 基因的表达有助于提高植物对低磷胁迫的耐受性, 且 *OsMGD3* 的作用可能优于 *OsMGD2*。

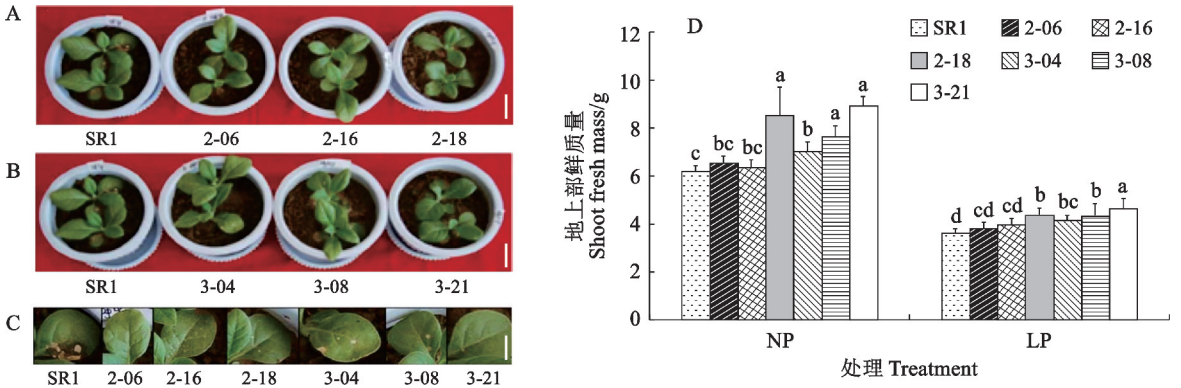


柱状图上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 低磷胁迫下烟草 *OsMGD2/3* 基因的表达模式

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

Fig. 2 Expression pattern of the *OsMGD2/3* genes in tobacco under low phosphorus stress



A. 低磷胁迫下 *OsMGD2* 转基因烟草叶片的生长情况, 标尺 5 cm; B. 低磷胁迫下 *OsMGD3* 转基因烟草叶片的生长情况, 标尺 5 cm; C. 低磷胁迫下 *OsMGD2/3* 转基因烟草老叶的生长情况, 标尺 1 cm。

柱状图上不同小写字母表示相同处理下野生型与不同株系之间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图 3 低磷胁迫下野生型 (SR1) 和 *OsMGD2/3* 转基因烟草的生长状况 (A-C) 和地上部生物量 (D)

A. Leaf growth of the *OsMGD2* transgenic tobaccos under P deficiency. Bar=5 cm. B. Leaf growth of the *OsMGD3* transgenic tobaccos under P deficiency. Bar=5 cm. C. Old leaf growth of the *OsMGD2/3* transgenic tobaccos under P deficiency. Bar=1 cm.

Different lowercase letters indicate significant difference between the wild type and different lines under the same treatment ($P < 0.05$). The same as below.

Fig. 3 Growth (A-C) and shoot fresh mass (D) of the wild-type SR1 and *OsMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

2.4 过表达 *OsMGD2/3* 基因对低磷胁迫下烟草光合特性的影响

如图 4 所示, 正常磷水平下, *OsMGD2/3* 转基因烟草的叶绿素含量相较于野生型 SR1 增加了 7.64% ~ 33.36%, 其中, *OsMGD2-06*、2-18 及 *OsMGD3-04*

和 3-21 的叶绿素含量分别增加了 12.71%、33.36%、19.73% 和 13.25%。低磷处理下, *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 各转基因株系的叶绿素含量均明显高于野生型。与叶绿素含量变化相似, 低磷胁迫下 *OsMGD2/3* 转基因植株的净光合速率显著高于野生

型(图 4)。叶绿素和荧光参数测定结果表明,低磷胁迫导致 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)、实际光合量子产量(Φ_{PSII})以及相对电子传递速率(ETR)较

正常磷处理均明显下降(图 4)。低磷胁迫下,与野生型烟草 SR1 相比,*O_sMGD2/3* 各转基因株系的光合效率和光合电子传递能力仍维持在较高水平。

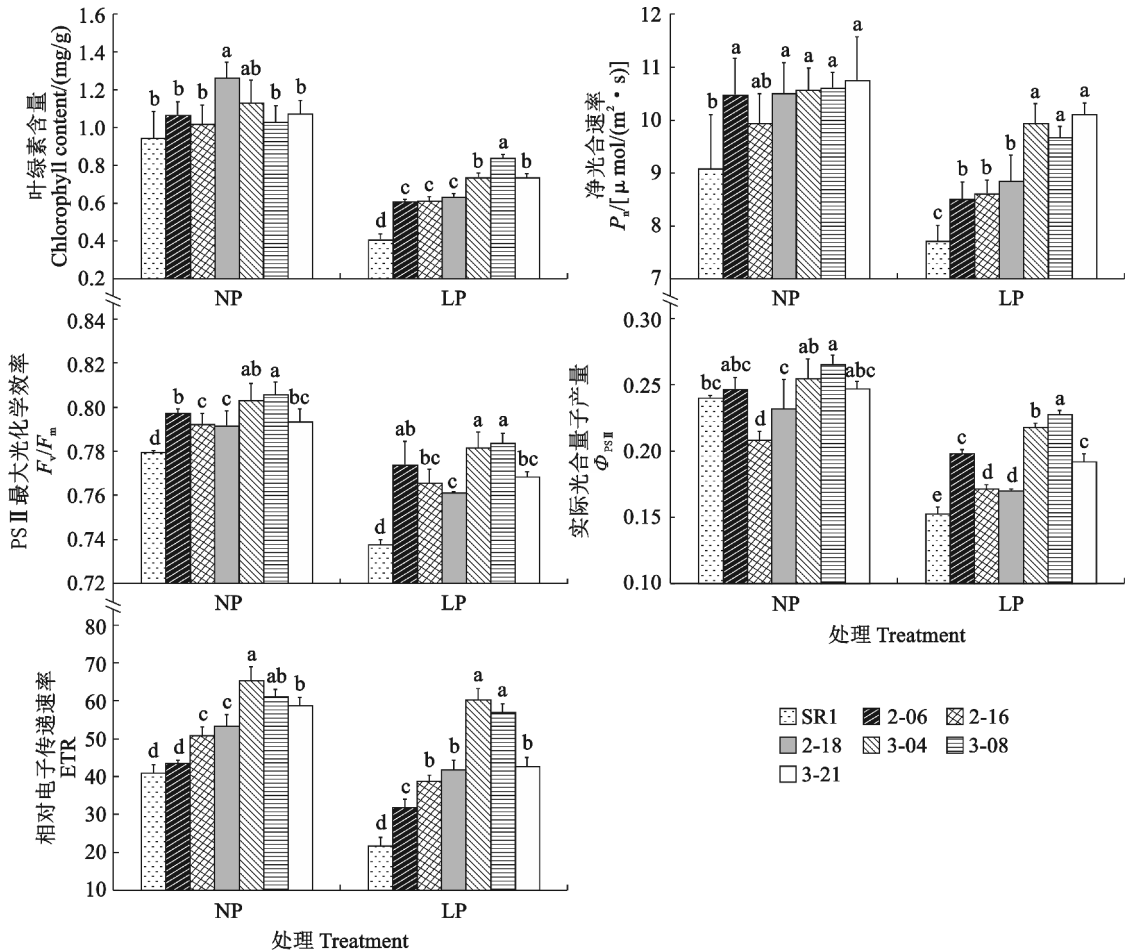


图 4 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *O_sMGD2/3* 转基因烟草的叶绿素含量和光合能力

Fig. 4 Chlorophyll content and photosynthetic capacity of the wild-type SR1 and *O_sMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

低磷胁迫下 *O_sMGD2* 和 *O_sMGD3* 转基因烟草各株系的平均 Φ_{PSII} 比野生型 SR1 分别平均增长了 17.04% 和 37.56%, ETR 分别增加了 24.26% ~ 60.01% 和 46.37% ~ 177.31%。此外, *O_sMGD3* 转基因烟草的 Φ_{PSII} 和 ETR 均高于 *O_sMGD2* 转基因烟草植株。上述结果表明,超表达 *O_sMGD2/3* 基因有助于提高烟草植株在低磷胁迫下的光能的吸收和转化能力。

2.5 过表达 *O_sMGD2/3* 基因对低磷胁迫下烟草地上部磷含量的影响

如图 5 所示,低磷胁迫抑制了植株地上部的磷含量,低磷条件下地上部磷含量约为正常条件下的 1/5,在 2 种磷处理下, *O_sMGD2/3* 转基因烟草的磷含量与野生型 SR1 均无明显差异,表明过表达 *O_s*

MGD2/3 基因并没有影响植物对磷的吸收和积累。

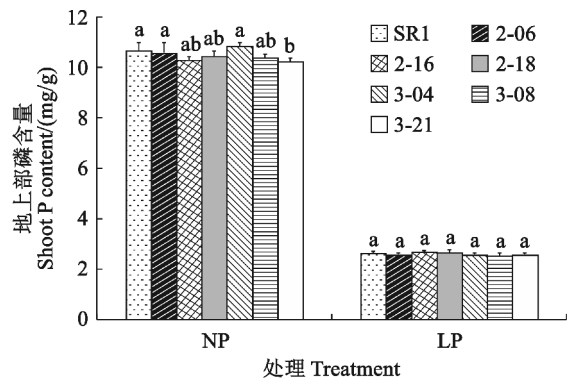


图 5 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *O_sMGD2/3* 转基因烟草地上部磷含量

Fig. 5 Shoot phosphorus content of the wild-type SR1 and *O_sMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

2.6 过表达 *OsMGD2/3* 基因在低磷胁迫下对烟草脂质含量的影响

如图 6 所示,正常磷水平下,除 *OsMGD3-04* 转基因烟草的总脂含量比野生型 SR1 增加了 10.83%,其余转基因株系的脂质含量与野生型没有差异。低磷胁迫下,*OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因植株的总脂含量显著高于野生型,分别增加了 21.61%和 33.47%。与总脂含量的变化相似,低磷胁迫导致植株的 PL 和 MGDG 含量显著下降,但是转基因植株的 PL 和 MGDG 含量显著高于野生型烟草的。与野生型烟草 SR1 相比,低磷处理后,*OsMGD2* 转基因烟草的平均 PL 含量增加了 49.92%,*OsMGD3* 转基因烟草的平均 PL 含量增加了 54.75%。同样,*OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因烟草的 MGDG 含量比 SR1 分别增加 13.33%和 34.49%。

此外,与 PL 和 MGDG 在低磷胁迫下降低不同,低磷处理显著提高了野生型和过表达株系的 DGDG 含量,且转基因株系的 DGDG 含量显著高于

野生型 SR1。进一步分析了不同株系中 GL/PL 以及 DGDG/MGDG 的值。发现正常磷水平下的野生型和 *OsMGD2/3* 转基因烟草的 GL/PL 值无显著差异。

在低磷条件下,*OsMGD2/3* 转基因烟草的 GL/PL 比值均高于野生型烟草 SR1,*OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因株系的 GL/PL 比值较野生型增加 25.98%和 28.36%;而 DGDG/MGDG 比值在低磷胁迫下显著增加,但 *OsMGD2* 和 *OsMGD3* 转基因烟草株系的 DGDG/MGDG 显著高于野生型烟草。

2.7 过表达 *OsMGD2/3* 基因在低磷条件下对脂肪酸组分及不饱和度的影响

不同磷水平条件下,烟草 MGDG、DGDG 和 PL 的脂肪酸组分不同。在正常磷和低磷水平下,C16:0 和 C18:3 脂肪酸为 PL 的主要成分,分别占 29.16%~35.55%和 22.14%~38.63%(表 2);C18:3 脂肪酸为 MGDG 和 DGDG 的主要成分,分别占 58.14%~70.12%和 45.93%~52.72%(表 3、表 4)。

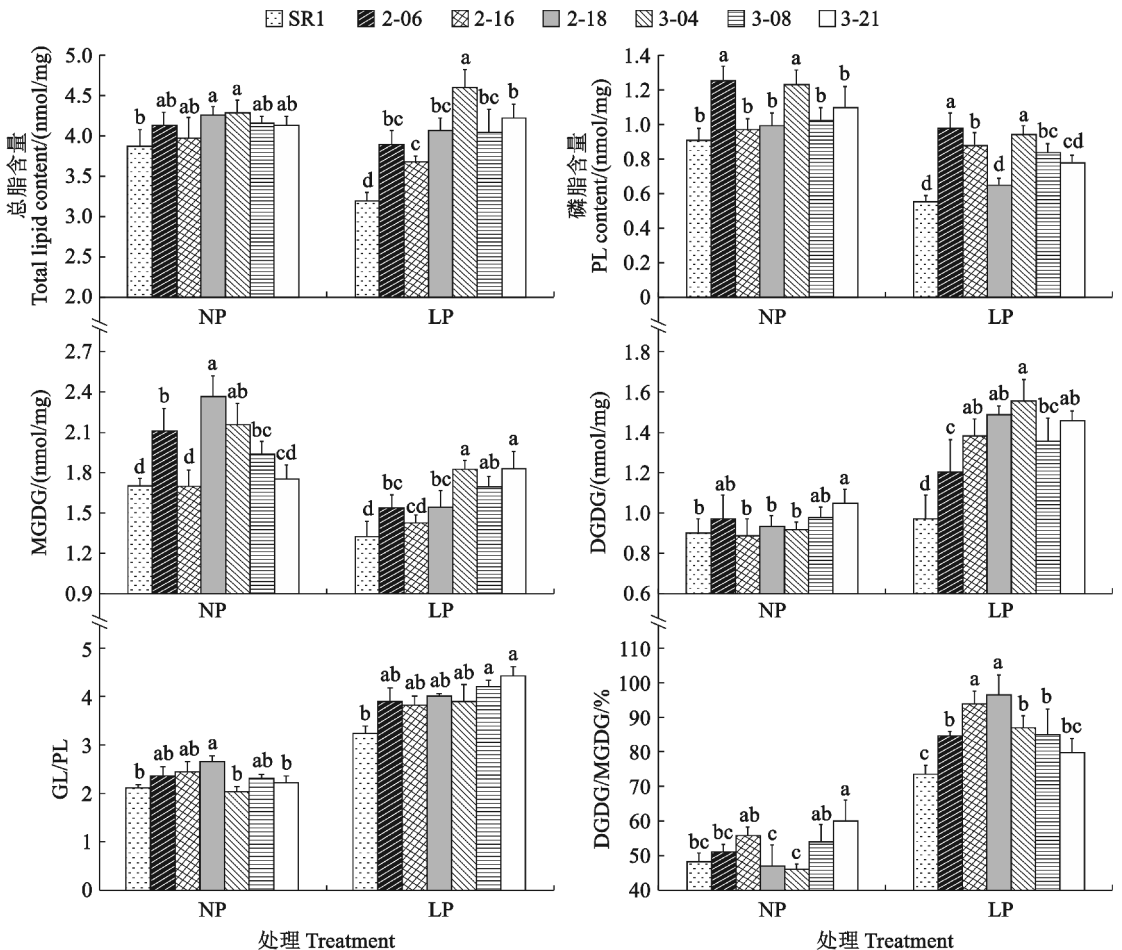


图 6 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *OsMGD2/3* 转基因烟草的脂质组分分析

Fig. 6 Lipid component of the wild-type SR1 and *OsMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

表 2 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *OsMGD2/3* 转基因烟草中 PL 的脂肪酸组分
Table 2 Fatty acid composition in PL of the wild-type SR1 and *OsMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

烟草株系 Tobacco line	处理 Treatment	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
SR1	NP	31.66±0.75cd	0.77±0.05e	1.13±0.18cd	1.80±0.24a	9.57±0.30ef	7.69±0.62a	15.74±1.48e	31.68±1.35c
	LP	36.16±0.11a	1.68±0.10d	1.19±0.15bcd	1.04±0.06cde	10.88±0.15bc	1.84±0.01g	25.15±0.67a	22.14±1.08e
2-06	NP	30.19±2.02e	5.09±0.64a	0.93±0.05cd	1.36±0.10b	6.24±0.30i	8.62±0.85a	12.66±0.45g	35.12±1.37ab
	LP	32.73±1.31cd	3.14±0.01bc	1.40±0.07abc	0.51±0.12f	8.27±0.24g	2.34±0.11fg	20.56±1.90bc	31.12±0.48c
2-16	NP	29.33±0.66e	0.93±0.15e	1.22±0.27cd	1.33±0.14bcd	8.08±0.80h	8.09±0.22a	14.49±0.51f	36.52±1.41a
	LP	31.99±0.82cde	3.43±0.42bc	1.76±0.19a	1.19±0.15bcd	9.31±0.14f	2.50±0.42ef	21.36±1.33b	28.62±1.59d
2-18	NP	31.07±0.67cde	1.26±0.37e	1.05±0.12cd	1.37±0.10b	8.62±0.36g	3.15±0.11de	16.23±0.74e	36.95±0.18a
	LP	34.21±0.54ab	3.42±0.11be	1.17±0.19bcd	0.96±0.06de	9.61±0.53ef	2.86±0.30ef	19.70±1.91cd	28.28±1.11d
3-04	NP	30.53±0.45cde	1.63±0.26d	0.84±0.15cd	1.16±0.06bcd	9.57±0.07ef	7.74±0.06a	12.15±0.71h	36.32±0.13ab
	LP	31.72±0.20cd	3.23±0.33b	1.57±0.17ab	0.84±0.03e	12.11±0.19a	2.94±0.34ef	16.69±0.32e	30.89±0.62c
3-08	NP	30.56±0.93de	0.84±0.08e	1.63±0.32a	1.20±0.19bc	9.62±0.37de	6.71±0.06b	15.84±0.74e	35.34±0.90ab
	LP	32.22±0.48bc	3.26±0.20be	1.30±0.21cd	0.87±0.21cde	11.18±0.53f	3.92±0.56d	18.87±1.08cd	28.40±0.70d
3-21	NP	34.23±1.22ab	0.73±0.09e	1.07±0.17cd	1.07±0.11cde	9.54±0.28 b	3.97±0.34c	14.36±0.86fg	35.41±1.91b
	LP	35.55±0.44a	2.82±0.14c	0.77±0.07cd	0.82±0.14e	10.51±0.23cd	2.71±0.46ef	17.47±0.20de	29.32±0.38cd

注: $n=3$; 不同小写字母表示不同处理和株系之间差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: $n=3$; different lowercase letters indicate significant difference among different treatments and lines ($P<0.05$). The same as below.

表 3 低磷胁迫下野生型 (SR1) 和 *O_sMGD2/3* 转基因烟草中 MGDG 的脂肪酸组分
 Table 3 Fatty acid composition in MGDG of the wild-type (SR1) and *O_sMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

烟草株系 Tobacco line	处理 Treatment	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
SR1	NP	6.43±0.73gh	0.26±0.05b	1.52±0.27a	17.53±0.38a	1.96±0.40f	1.09±0.23bcd	6.52±0.68b	65.37±1.79de
	LP	14.43±1.72a	0.33±0.03b	1.19±0.21bcd	12.94±0.24f	2.71±0.64ef	0.97±0.13cde	9.30±0.18a	58.14±0.84f
2-06	NP	6.27±0.16fgh	0.35±0.11b	1.30±0.11abc	14.83±0.88c	2.09±0.28ef	1.73±0.55bcde	5.50±0.42c	67.94±0.37bcde
	LP	9.62±0.70bc	0.67±0.21a	0.81±0.04hij	13.18±0.81def	2.48±0.35def	0.66±0.08de	5.67±0.56c	67.03±1.53cde
2-16	NP	5.72±0.12h	0.24±0.01b	0.91±0.12efg	13.58±0.58ef	2.66±0.65def	1.30±0.28bc	6.29±0.67b	69.30±1.02abc
	LP	9.00±1.56cd	0.27±0.04b	1.08±0.05def	11.15±0.65h	2.86±0.62cd	0.82±0.21cde	6.94±0.11b	67.88±1.58bcde
2-18	NP	5.05±0.25h	0.25±0.05b	1.24±0.17cde	14.35±0.33cd	2.20±0.17ef	0.78±0.02de	4.04±0.30d	72.07±0.28a
	LP	8.45±0.30de	0.18±0.03b	0.99±0.15ghi	12.01±0.42gh	2.85±0.45def	0.61±0.15de	5.44±0.32c	69.73±0.74abcd
3-04	NP	5.24±0.71h	0.28±0.06b	1.23±0.13cde	15.41±1.18b	2.43±0.32de	2.19±0.28a	6.92±0.65b	66.30±1.76e
	LP	7.80±0.90ef	0.17±0.03b	0.69±0.08j	13.22±1.36g	3.58±0.55ef	0.72±0.20bcde	8.96±0.21a	64.87±0.60e
3-08	NP	6.90±0.49efg	0.16±0.01b	1.36±0.16ab	14.25±0.24cde	4.17±0.38c	1.11±0.12bcd	5.32±0.12c	66.87±1.08cde
	LP	10.47±0.08b	0.19±0.05b	0.81±0.05ij	11.50±1.45gh	5.05±0.25bef	0.77±0.16cde	6.69±0.25b	64.56±1.38e
3-21	NP	5.43±0.31h	0.17±0.09b	1.33±0.06bc	14.44±0.21cd	2.03±0.06a	1.25±0.24b	5.60±0.68c	69.12±0.63abcd
	LP	7.60±1.22e	0.13±0.02b	1.23±0.09bcd	13.44±0.60cde	2.17±0.55ef	0.59±0.08e	6.23±0.19b	68.84±2.26ab

表 4 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *OsMGD2/3* 转基因烟草中 DGDG 的脂肪酸组分
 Table 4 Fatty acid composition in DGDG of the wild-type (SR1) and *OsMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

烟草株系 Tobacco line	处理 Treatment	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
SR1	NP	21.84±1.87c	5.01±0.29b	0.96±0.10b	2.22±0.03a	5.10±0.71cd	3.78±0.87bcd	10.90±0.44b	52.80±2.70e
	LP	25.25±0.61a	4.76±0.11c	0.68±0.06b	1.85±0.02bcde	6.73±0.24ab	1.93±0.99abc	12.86±0.42a	45.93±1.66f
2-06	NP	19.28±1.01de	0.50±0.06g	1.04±0.18b	2.21±0.14a	6.06±0.38bc	3.88±0.53a	8.22±1.31d	58.84±0.69c
	LP	23.45±0.52b	0.25±0.07g	0.90±0.12b	1.98±0.07b	7.42±0.74a	1.29±0.29e	12.88±1.33a	51.82±1.00e
2-16	NP	17.71±0.82g	6.07±0.30a	1.06±0.22b	1.81±0.25bcd	4.87±0.42de	2.75±0.50ab	7.66±0.10de	58.28±1.36bc
	LP	21.59±0.77c	5.70±0.36ab	0.96±0.07b	1.58±0.12g	6.21±0.89cd	1.90±0.30cde	8.42±0.93d	53.90±1.45d
2-18	NP	19.25±1.57fg	3.96±0.60d	0.86±0.24b	1.94±0.20bcde	2.94±0.23g	1.76±0.36de	6.55±0.44f	62.72±1.38a
	LP	22.97±0.45b	3.41±0.10e	0.86±0.18b	1.62±0.14fg	3.64±0.34fg	1.31±0.04e	7.37±0.21de	58.84±0.31bc
3-04	NP	19.29±0.44def	3.26±0.49e	0.76±0.03b	2.00±0.02bc	4.40±0.48f	3.69±0.42a	7.96±0.26de	59.01±1.05bc
	LP	21.48±0.27c	2.26±0.02f	1.58±0.26a	1.78±0.14def	5.53±0.68bc	1.56±0.04de	9.54±0.96c	56.56±0.36d
3-08	NP	17.48±0.13fg	5.23±0.20b	0.70±0.04b	1.83±0.02cdef	3.45±0.27fg	3.01±0.34abc	8.28±0.42de	60.27±0.40bc
	LP	20.01±0.66cd	4.24±0.01d	0.73±0.04b	1.65±0.06efg	3.97±0.50fg	1.81±0.20de	9.63±0.18c	57.95±0.50c
3-21	NP	18.14±0.29efg	3.84±0.26de	0.82±0.26b	2.41±0.13a	3.89±0.09fg	2.25±0.10bcde	7.18±0.06e	61.31±0.35ab
	LP	20.56±0.82c	2.40±0.09f	0.66±0.06b	2.05±0.09bc	4.92±0.74cd	1.33±0.26de	8.39±0.48d	59.67±1.24bd

低磷条件下,野生型 SR1 和 *OsMGD2/3* 转基因烟草植株的 PL、MGDG 和 DGDG 的 C16:0 和 C18:2 显著增加,MGDG 的 C16:3 和 C18:3 降低;PL 和 DGDG 中的 C16:0、C18:2 和 C18:3 显著降低。

如图 7 所示,正常磷条件下,MGDG 的 DBI 最大,DGDG 次之,PL 的 DBI 最小。低磷胁迫均降低了 PL、MGDG 和 DGDG 的 DBI,相较于野生型,*OsMGD2/3* 转基因植株的 DBI 下降幅度较小,且 *OsMGD3* 中,MGDG 和 DGDG 的 DBI 均高于 *OsMGD2*。

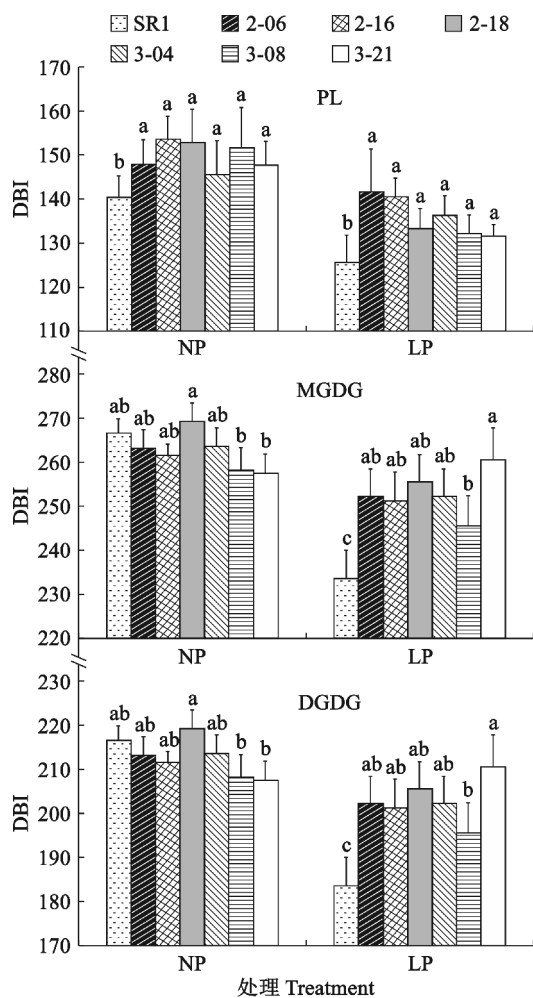


图 7 低磷胁迫下野生型(SR1)和 *OsMGD2/3* 转基因烟草脂质的 DBI

Fig. 7 DBI of the wild-type (SR1) and *OsMGD2/3* transgenic tobacco plants under P deficiency

3 讨论

植物对磷缺乏的耐受性主要由磷的获取能力和磷利用效率决定^[23-25]。本研究中,过表达 *OsMGD2/3*

基因,可显著提高烟草对低磷胁迫的耐受性。低磷条件下 *OsMGD2/3* 转基因烟草与野生型烟草的磷含量无显著差异,说明调控 *OsMGD* 基因的表达并不能提升植株对磷的获取能力,而是通过提高植物的磷利用效率来提高耐低磷能力。

在缺磷条件下,磷的重新分配和再利用是植物提高磷利用效率的关键,也是植物耐低磷胁迫的重要途径^[24]。植物的细胞膜具有多种成分和不同结构,为适应不同环境,膜脂的组分和结构会发生相应变化,这个过程称之为“膜脂重塑”^[5,8]。磷脂和半乳糖脂是膜脂中含量最高的 2 种脂质,在膜脂重塑过程中,这 2 种脂质会发生互补替换维持膜的正常功能^[9]。磷除了是植物细胞中 ATP、核酸等重要组成部分外,约 1/3 的磷是以磷脂的形式存在于细胞膜中^[26]。有研究表明,“膜脂重塑”也是植物响应低磷胁迫的机制,即缺磷时,细胞膜中的磷脂发生水解,释放出无机磷,用于维持必要的生命活动,而植物会合成更多半乳糖脂弥补减少的磷脂来维持细胞膜的基本功能^[14]。因此,“膜脂重塑”是植物响应低磷的重要机制。

前人研究发现拟南芥 Type B 型 MGD 酶在缺磷环境下的“膜脂重塑”过程中起至关重要作用^[5]。低磷条件下,以尿苷二磷酸-半乳糖(uridinediphosphate-galactose, UDP-Gal)和二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)为前体,在 MGD 酶的作用下合成 MGDG,在 DGD 酶的催化下进一步合成 DGDG,以填补缺失的 PL,维持磷饥饿条件下细胞膜的完整性,提升磷利用效率^[5,27]。拟南芥 *mgd3-1* 突变体和 *mgd2-mgd3* 双突变体在低磷条件下,DGDG 含量大幅减少且植株对缺磷的敏感性增强^[5]。本研究中低磷胁迫下野生型和转基因烟草中 PL 和 MGDG 含量下降,DGDG 含量增加,且转基因烟草中的 PL、MGDG 和 DGDG 含量均高于野生型。磷脂与半乳糖脂的比值可以很好表征半乳糖脂取代磷脂的能力,而 DGDG 与 MGDG 的比值则直观表示 MGD 酶的调节能力及 DGDG 补充损失磷脂的能力^[8]。本研究中低磷条件下 *OsMGD2/3* 转基因植株的比值均高于野生型,这表明 *OsMGD2/3* 基因过表达能提高半乳糖脂与磷脂的比例,即生成更多的半乳糖脂以替代损失的磷脂。由此可知,*OsMGD2/3* 基因过表达有利于增加 MGDG 和 DGDG 的含量,提高植物低磷胁迫下的膜脂重塑能力。

半乳糖脂替换磷脂是膜脂重塑响应低磷胁迫的重要途径。低磷条件下,转基因植株维持了较高的叶绿素含量,光合作用和电子传递能力,说明转基因植株有较高的 ATP 合成能力,即具有相对较好的磷供应能力。此外,膜脂的组分和含量不同会影响生物膜的稳定性和流动性,也会导致其响应逆境胁迫的能力不同^[28-29]。这种生物膜的流动性可以通过 DBI 反映,DBI 越高,其流动性越好,越有利于维持膜的正常功能。本研究结果表明在低磷条件下 *OsMGD2/3* 转基因烟草的 PL、MGDG 和 DGDG 仍能维持较高的 DBI。表明转基因烟草在低磷下具有更好的结构和功能,也维持了正常的光合作用,促进生长,进而提高对低磷胁迫的耐受性。

参考文献:

- [1] LAMBERS H. Phosphorus acquisition and utilization in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2022, 73: 17-42.
- [2] HALLAMA M, PEKRUN C, LAMBERS H, *et al.* Hidden miners—the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems [J]. *Plant and Soil*, 2019, 434(1): 7-45.
- [3] 张乃于,同双堆,李娟,等. 低分子量有机酸对土壤磷组分影响的 Meta 分析 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(12): 2076-2083.
- ZHANG N Y, TAN S D, LI J, *et al.* Meta-analysis on the effects of low molecular weight organic acids on increasing availability of soil phosphorus [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(12): 2076-2083.
- [4] CEASAR S A. Feeding world population amidst depleting phosphate reserves: The role of biotechnological interventions [J]. *The Open Biotechnology Journal*, 2018, 12(1): 51-55.
- [5] KOBAYASHI K, AWAI K, NAKAMURA M, *et al.* Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(2): 322-331.
- [6] 周峰. 不同膜脂环境中 PS II 核心复合物和外周天线之间的功能关系 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [7] CHNG C P, WANG K, MA W, *et al.* Chloroplast membrane lipid remodeling protects against dehydration by limiting membrane fusion and distortion [J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(1): 526-539.

4 结 论

(1) 调控烟草 *OsMGD2/3* 基因的表达, 可通过提升磷利用效率提高植物的耐低磷能力。

(2) *OsMGD2/3* 转基因烟草能增加 MGDG 和 DGDG 的含量, 提高 GL 与 PL 的比例和 DBI, 增强植物低磷胁迫下膜脂重塑能力。

(3) 通过膜脂重塑提高磷的利用效率, 可促进 *OsMGD2/3* 转基因植物在低磷胁迫下维持较高的光合能力和生长, 提高植物对低磷的耐受性。

(4) 通过调控水稻 Type B 型 *OsMGD2/3* 基因表达可调控植物对低磷的响应。

- [8] VERMA L, RUMI, SINHA A K, *et al.* Phosphate deficiency response and membrane lipid remodeling in plants [J]. *Plant Physiology Reports*, 2021, 26(4): 614-625.
- [9] KOBAYASHI K, AWAI K, TAKAMIYA K, *et al.* Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(2): 640-648.
- [10] BASNET R, ZHANG J, HUSSAIN N, *et al.* Characterization and mutational analysis of a monogalactosyldiacylglycerol synthase gene *OsMGD2* in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 992.
- [11] VERMA L, KOHLI P S, MAURYA K, *et al.* Specific galactolipids species correlate with rice genotypic variability for phosphate utilization efficiency [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 168: 105-115.
- [12] ROCHA J, CHAZALET V, BRETON C. Expression, purification and crystallization of recombinant *Arabidopsis* monogalactosyldiacylglycerol synthase (*MGDI*) [J]. *Bioprotocol*, 2016, 6: e2064.
- [13] MYERS A M, JAMES M G, LIN Q H, *et al.* Maize opaque5 encodes monogalactosyldiacylglycerol synthase and specifically affects galactolipids necessary for amyloplast and chloroplast function [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2331-2347.
- [14] KOBAYASHI K, MASUDA T, TAKAMIYA K I, *et al.* Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(2): 238-248.

- [15] GAO Q M, YU K S, XIA Y, *et al.* Mono- and digalactosyl-diacylglycerol lipids function nonredundantly to regulate systemic acquired resistance in plants[J]. *Cell Reports*, 2014, 9(5): 1681-1691.
- [16] 孟超敏, 卿桂霞, 耿翡翠, 等. 陆地棉 *MGDG* 基因家族低磷胁迫下的表达分析[J]. 西北植物学报, 2023, 43(7): 1081-1089.
- MENG C M, QING G X, GENG F F, *et al.* Expression analysis of the *MGDG* gene family of *Gossypium hirsutum* L. under low phosphorus stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(7): 1081-1089.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻Delta Delta C(T) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [19] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [20] 张梅娟. 水稻 *MGD* 同源基因的克隆及功能研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [21] WEWER V, DÖRMANN P, HÖLZL G. Analysis and quantification of plant membrane lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1009: 69-78.
- [22] CHEN M, LIU Y, SUI N, *et al.* The bioenergy plant hybrid *Pennisetum* improves chilling resistance by enhancing the unsaturation of membrane lipid under low temperature[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2014, 521: 81-87.
- [23] HASAN M M, HASAN M M, TEIXEIRA DA SILVA J A, *et al.* Regulation of phosphorus uptake and utilization: Transitioning from current knowledge to practical strategies[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2016, 21: 7.
- [24] MAHARAJAN T, CEASAR S A, AJEESH KRISHNA T P, *et al.* Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants[J]. *Plant Breeding*, 2018, 137(1): 10-26.
- [25] CAMPOS P, BORIE F, CORNEJO P, *et al.* Phosphorus acquisition efficiency related to root traits: Is mycorrhizal symbiosis a key factor to wheat and barley cropping? [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 752.
- [26] MEHRA P, PANDEY B K, VERMA L, *et al.* A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase improves phosphate deficiency tolerance in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(4): 1167-1179.
- [27] WANG J X, PAN W B, NIKIFOROV A, *et al.* Identification of two glycerophosphodiester phosphodiesterase genes in maize leaf phosphorus remobilization[J]. *The Crop Journal*, 2021, 9(1): 95-108.
- [28] NARAYANAN S, PRASAD P V, WELTI R. Wheat leaf lipids during heat stress: II. Lipids experiencing coordinated metabolism are detected by analysis of lipid co-occurrence[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(3): 608-617.
- [29] WANG Y W, JIANG D X, CHEN J J H G X. Physiological characterization and thylakoid ultrastructure analysis in super high-yield hybrid rice leaves under drought stress[J]. *Photosynthetica*, 2019, 57(3): 890-896.