

亚磷酸脱氢酶在基因工程改造微生物和植物中的研究进展

孙佳琪^{1,2}, 郭嘉², 张闯², 柳青², 王梓钰², 夏涵超², 钱步轩², 赵方方², 王棋², 刘剑锋^{1*}, 刘相国^{2*}

1.吉林师范大学生命科学学院, 吉林 四平 136000;

2.吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)农业生物技术研究, 长春 130033

摘要:近年来,农业生产面临磷源匮乏和环境污染的双重挑战,亚磷酸脱氢酶(phosphite dehydrogenase, PTDH)的发现和应用于解决这一问题提供了新的思路。在微生物中,PTDH使得非无菌环境下的高效发酵成为可能,降低了成本并提高了生产效率。在植物中,PTDH不仅解决了磷源问题,还为除草剂的开发提供了新的途径。此外,亚磷酸盐可作为一种潜在的除草剂和磷源使用,相比传统除草剂更环保、成本更低、稳定性更好。尽管亚磷酸脱氢酶的应用研究取得了显著进展,但目前仍处于功能解析和概念验证阶段,对亚磷酸脱氢酶的催化机理、蛋白结构和酶活改良等方面的研究还需进一步深入。综述了PTDH在微生物、模式植物(如拟南芥和烟草)、经济作物(如棉花和油菜)以及粮食作物(如水稻和玉米)中的应用进展。随着蛋白质定向进化技术、基因转化和基因编辑技术的发展,未来将进一步优化亚磷酸脱氢酶的应用效果,为作物的高效利用亚磷酸盐 and 环境保护提供更多可能。

关键词:亚磷酸脱氢酶;磷源;基因工程;微生物;植物

DOI:10.19586/j.2095-2341.2023.0157

中图分类号:Q789, S18

文献标志码:A

Research Progress of Phosphite Dehydrogenase in Genetically Engineered Microorganisms and Plants

SUN Jiaqi^{1,2}, GUO Jia², ZHANG Chuang², LIU Qing², WANG Ziyu², XIA Hanchao², QIAN Buxuan², ZHAO Fangfang², WANG Qi², LIU Jianfeng^{1*}, LIU Xiangguo^{2*}

1.College of Life Sciences, Jilin Normal University, Jilin Siping 136000, China;

2.Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences (Northeast Agricultural Research Center of China), Changchun 130033, China

Abstract: In recent years, agricultural production is facing the dual challenges of phosphorus deficiency and environmental pollution. The discovery and application of phosphite dehydrogenase (PTDH) provides a new idea to solve this problem. In microorganisms, PTDH makes efficient fermentation in non-sterile environments possible, reducing costs and increasing production efficiency. In plants, PTDH not only solves the problem of phosphorus source, but also provides a new way for the development of herbicides. In addition, the use of phosphite as a potential herbicide and phosphorus source is more environmentally friendly, low cost and stable than traditional herbicides. Although significant progress has been made in the application of phosphite dehydrogenase, the current research is still in the stage of functional analysis and conceptual verification. The research on the catalytic mechanism, protein structure and enzyme activity improvement of phosphite dehydrogenase needs to be further studied. This study reviewed the application of PTDH in microorganisms, model plants (such as *Arabidopsis* and tobacco), cash crops (such

收稿日期:2023-12-07; 接受日期:2024-01-04

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32171928);吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)基本科研经费项目(KYJF2023DX006);吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2023RCG006);吉林省农业科技创新工程人才基金项目(CXGC2022RCY009)。

联系方式:孙佳琪 E-mail: 1094233375@qq.com

* 通信作者 刘剑锋 E-mail: jianfengliu1976@163.com; 刘相国 E-mail: lxgyj@cjaas.com

as cotton and rapeseed) and food crops (such as rice and corn). In the future, with the development of protein directed evolution technology, gene transformation and gene editing technology, the application effect of phosphite dehydrogenase will be further optimized, which will provide more possibilities for efficient utilization of phosphite and environmental protection of crops.

Key words: phosphite dehydrogenase; phosphorus source; genetic engineering; microorganism; plant

当前,过度施用磷肥以及除草剂以增加作物产量已成为常态,但是随之而来的是种植成本增加和环境污染等一系列问题。在农业生产中,植物只能利用磷酸盐作为磷的来源,土壤中的磷酸盐含量有限,与之相比,亚磷酸盐在土壤中含量相对较丰富。然而,藻类甚至是包括植物在内的高级生物都无法代谢亚磷酸盐。一些研究表明^[1-3],在拟南芥、水稻等植物以及枯草芽孢杆菌等微生物中导入亚磷酸脱氢酶基因,可以创制转基因植物和微生物,使其能够代谢亚磷酸盐为磷酸盐,从而将亚磷酸盐作为磷的来源。这种方法既解决了磷源匮乏的问题,又不会对环境造成污染。此外,这些转基因植物和微生物还具有除草和杀菌等额外的功能,为我国在提高农业可持续发展方面提供了新的思路。

1 亚磷酸脱氢酶的发现和作用机理

1.1 亚磷酸脱氢酶的发现

早期人们对于还原态磷化合物的氧化代谢遗传以及生化机制的了解非常有限。尽管在自然界的许多生物体中存在还原性磷化合物,并且已经有报道称微生物中存在氧化低价态磷化合物^[4],但仍缺乏深入研究。直到 Costas 等^[5]在施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri* WM 88)中发现了微生物中+3还原价态的亚磷酸脱氢酶-P(phosphite dehydrogenase-P, PTDH-P)的代谢途径以及生理生化机制,并通过蛋白纯化以及基因克隆等方法得到了与亚磷酸代谢相关的基因,PTDH才走入人们的视野。亚磷酸脱氢酶^[5-6]是一种依赖氧和NAD⁺的特殊酶,具有将亚磷酸盐氧化为磷酸盐的催化能力。在这个过程中,+3价的磷原子被氧化为+5价,亚磷酸盐/磷酸盐的氧化还原电位为-0.65V^[7]。研究还发现,在*P. stutzeri* WM 88中亚磷酸氧化为磷酸的过程包括两个部分,由其中的两个基因簇htx和ptx催化,从次磷酸开始,经历亚磷酸,最终形成磷酸。2011年,Ryuichi等^[8]在罗尔斯通菌属中获得了催化效率更高的亚磷酸脱氢

酶PTDH-R,其催化效率大约是PTDH-P的6倍,并且亚磷酸脱氢酶PTDH-R对亚磷酸盐的亲合力提高了约30%。这一发现对于理解亚磷酸代谢机制具有重要意义,也为后续的应用研究提供了宝贵的的基础。

1.2 亚磷酸脱氢酶的结构和作用机理

亚磷酸脱氢酶是一个由两个结构域组成的同源二聚体,这两个结构域分别是底物亚磷酸盐结合结构域和NAD⁺结合结构域,它们之间由弹性铰链连接(图1)。底物亚磷酸盐结合结构域由2个不相邻和不连续的部分组成^[9]。其中一部分较大,由5个平行的 β 折叠和4个 α 螺旋构成,另一部分比较小,由1个额外的螺旋结构组成。NAD⁺结合结构域具有Rossmann卷曲结构^[10],包括交叉折叠的2对 α 螺旋和6个 β 折叠。



图1 PTDH同源模型中活性位点图^[11]

Fig. 1 View of an active site in a homologous model of PTDH^[11]

亚磷酸脱氢酶对底物的特异性非常强,只能利用亚磷酸作为底物进行催化,同时,辅酶也只能是NAD⁺(图1)。从化学热力学角度而言,亚磷酸脱氢酶氧化亚磷酸为磷酸的过程是不可逆的^[11],反应的平衡常数大约是 10^{11} ,因此可知酶对底物的 K_m 值很小。这个氧化还原反应的实质是磷酰基从氢化物到氢氧化化合物的转移过程。通过对亚磷酸脱氢酶的336个氨基酸序列比对可知,亚磷酸脱氢酶属于D-2-羟酸脱氢酶家族,这一家族中含有3个催化活性所必需的保守氨基酸残基,分别是Arg237、His293和Glu266。研究发现,亚磷酸脱

氢酶在经过焦碳酸二乙酯处理后,His293会被选择性修饰,使其完全丧失活性。这说明 His293 在反应过程中发挥关键作用。亚磷酸脱氢酶催化亚磷酸的过程是连续且有序的。亚磷酸脱氢酶先与

NAD⁺作用,导致酶的构象发生改变,使其容易与亚磷酸结合,反应结束后先释放产物亚磷酸,再释放 NADH^[5]。整个反应过程的快慢由氢离子转移的快慢所决定^[12]。



图2 亚磷酸脱氢酶的催化过程
Fig. 2 Catalytic process of phosphite dehydrogenase

2 亚磷酸脱氢酶的应用

2.1 亚磷酸脱氢酶基因在微生物和藻类中的应用

亚磷酸脱氢酶编码基因最初是从微生物中克隆得到的。研究发现该类酶只存在于少量特殊的微生物中,大多数微生物并不含有亚磷酸脱氢酶编码基因,因此它们无法将亚磷酸盐作为磷源^[13-15]。Stone 和 White^[16]广泛调查了土壤和淡水中的微生物,发现只有少数的细菌能利用亚磷酸

盐作为唯一的磷源,且这些微生物通常是通过同化亚磷酸酯氧化的过程将亚磷酸盐氧化为磷酸盐^[17]。关于这个过程的生化机制和遗传基础已经得到广泛研究^[6,18-20]。此外,亚磷酸还被证实可作为杀菌剂,用于抑制杂菌的生长^[21]。因此,在基因工程领域,将亚磷酸脱氢酶基因导入微生物和藻类中,可以创制具有亚磷酸脱氢酶活性的转基因微生物和藻类,下文对部分微生物和藻类的用途进行了综述(表1)。

表 1 亚磷酸脱氢酶基因在微生物中的应用

Table 1 Application of phosphite dehydrogenase genes in microorganisms

基因来源	微生物种类	目标性状及产业化效果	参考文献
施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	建立抗菌污染体系,提高产物生产效率	[3]
施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	缩短发酵周期、简化发酵过程,降低生产成本,但目前连续发酵的赖氨酸产量不是很理想	[22]
施氏假单胞菌 WM88 (<i>Pseudomonas</i> sp. WM88)	莱恩衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	作为选择标记基因,建立转质体系使其成为鉴定转化菌株的有效工具	[23-24]

2.1.1 亚磷酸脱氢酶基因在枯草芽孢杆菌中的应用 微生物污染一直是影响发酵工程的重要问题。传统上,通常采用灭菌和加抗菌剂的方法进行微生物发酵灭菌,但是这种方法耗时耗力,容易产生耐药菌株,因此开发新策略降低微生物污染是非常必要的。2017年,陈氏小组^[25-27]报道了在非灭菌条件下,耐盐的 *Halomonas bluephagensis* 菌株能合成 PHB 或 P(3HB-co-4HB),初步证明了创制合适的菌株在未经灭菌的发酵环境中也能成功,操作方便且更有利。随后,Guo 等^[3]分别从施氏假单胞菌中引入亚磷酸脱氢酶和从幽门螺杆菌中引入甲酰胺酶,转入枯草芽孢杆菌中,

创制了转基因枯草芽孢杆菌,该基因工程菌株能够吸收亚磷酸盐和甲酰胺作为磷源和氮源,进而在发酵中成为优势菌种,合成乙酰菌素,而其他微生物因不能代谢亚磷酸盐和甲酰胺,缺乏关键营养物质不能存活。科研人员进一步通过筛选实验发现,亚磷酸浓度 15 mmol·L⁻¹、甲酰胺浓度 60 mmol·L⁻¹为转基因枯草芽孢杆菌加速生长的最佳浓度,在非灭菌条件下,78 h 内可以合成 25.46 g·L⁻¹的乙酰蛋白,产率为 0.33 g·L⁻¹·h⁻¹。在这个新型发酵体系中由于取消了灭菌环节,简化了发酵步骤,从而降低了发酵成本,提高了生产效率。

2.1.2 亚磷酸脱氢酶基因在谷氨酸棒状杆菌中的应用 谷氨酸棒状杆菌常用于生产赖氨酸和L-谷氨酸等氨基酸以及其他化学品^[28-31]。然而,谷氨酸棒状杆菌生产氨基酸的过程容易受到微生物污染,造成巨大损失。2021年,Lei等^[22]对谷氨酸棒状杆菌进行了改造,分别将多个菌株的亚磷酸脱氢酶基因转入谷氨酸棒状杆菌0206(Cg-0206)中,并使用亚磷酸盐作为唯一磷源进行培养筛选,发现来自施氏假单胞菌的亚磷酸脱氢酶基因对谷氨酸棒状杆菌的生长最为有利,将其命名为Cg-Pst,且在亚磷酸二氢钾浓度为8 mmol·L⁻¹时Cg-Pst生长状况最佳。为了进一步提高工程菌株的遗传稳定性,删除了Cg-0206基因组中exeR位点的基因,将来自施氏假单胞菌中的亚磷酸脱氢酶基因插入exeR位点,获得了CgΔexeR*Pst菌株。与原始Cg-0206菌株相比,在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上CgΔexeR*Pst菌株表现出更好的生长状况,细胞密度达到3×10⁹~4×10⁹ CFU·mL⁻¹。当CgΔexeR*Pst菌株与污染菌株在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上共培养时,CgΔexeR*Pst菌株可以快速恢复赖氨酸的生产效率,分别从7.00 g·L⁻¹恢复至39.67 g·L⁻¹和3.00 g·L⁻¹恢复至39.5 g·L⁻¹^[32]。因此,该实验表明,亚磷酸盐对菌株产生了显著的选择压力,使得CgΔexeR*Pst菌株在多种菌株共存的环境中,具有生长优势。将亚磷酸酸脱氢酶基因导入谷氨酸棒状杆菌用于非无菌条件发酵,既缩短了发酵周期、简化了发酵过程,也降低了生产成本,虽然连续发酵的赖氨酸产量不是很理想,但也为后续开发氨基酸发酵工程打下了良好的基础。

2.1.3 亚磷酸脱氢酶基因在莱茵衣藻中的应用 藻类是真核生物,能进行光合作用。莱茵衣藻是研究藻类向光性、光合作用以及鞭毛功能等方面的模式生物^[33-34]。在过去的研究中,莱茵衣藻的转质体技术主要用于生产复杂且高价值的化合物,例如疫苗、抗体等^[35-36]。近年来,人们开始致力于开发莱茵衣藻作为治疗药物的商品^[34,37]。为了实现莱茵衣藻的叶绿体转化,合适的标记基因是鉴定转化菌株的有效工具。传统的方式是使用抗生素作为选择标记,但存在潜在风险。作为一种替代方法,Sandoval-Vargas等^[23]在2019年研究了基于亚磷酸盐的选择方法用于恢复莱茵衣藻的叶绿体转化系,这是第一次将亚磷酸脱氢酶

基因作为便携式选择标记用于莱茵衣藻的叶绿体转化。将来自施氏假单胞菌WM88中的亚磷酸脱氢酶基因转入莱茵衣藻中,只有成功表达亚磷酸脱氢酶的细胞才能在只含亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上繁殖并产生菌落,且无假阳性菌落,说明亚磷酸脱氢酶基因可作为选择标记。此外,该研究还证明了当细胞缺磷培养14天再进行转化时,效率会提高,并且也不会出现假阳性。该试验的选择性标记增大了莱茵衣藻叶绿体遗传和代谢的可行性。

Cutolo等^[24]对来自于施氏假单胞菌WM88中的亚磷酸脱氢酶基因进行优化,转入莱茵衣藻中。与野生型蛋白的转质体系相比,携带优化后的亚磷酸脱氢酶基因的转质体系在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上生长更快,可以将亚磷酸盐代谢为磷酸盐,作为磷源利用。同时,将优化后的亚磷酸脱氢酶直接镀在只以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上,不仅可以抑制微生物污染,还可快速对转质体菌落进行筛选。该实验不仅增加了施用亚磷酸盐的可行性,而且还为合理优化的亚磷酸脱氢酶基因作为一种更安全、可靠的选择标记提供了理论依据。

2.2 亚磷酸脱氢酶在植物中的应用

植物只能利用磷酸盐作为磷的来源,然而土壤对无机磷的固定作用很强,导致植物能够利用的磷有限,无法满足作物的生长和发育需求。因此,寻找新的磷源成为一项重要任务。土壤中的亚磷酸盐具有很高的溶解度,容易被植物吸收。然而,亚磷酸盐对植物有一定的毒害作用,这是因为植物中缺乏代谢亚磷酸的酶,所以土壤中的亚磷酸盐会干扰植物的代谢过程,导致植物生长缓慢甚至死亡^[38-44]。早期研究在微生物中发现了能够使亚磷酸代谢为磷酸的亚磷酸脱氢酶。通过转基因技术将亚磷酸脱氢酶基因导入植物中创制基因工程植物,有望高效利用亚磷酸盐,进而缓解磷源不足的问题。此外,杂草一直是农业生产中的重大难题,随着传统除草剂施用量的不断增加,田间抗性杂草日益增多,目前已被证实产生抗性的除草剂大约有254种^[45],对作物生产构成严重威胁,因此亟需开发新的除草剂^[45-51]。天然植物无法代谢亚磷酸盐,因此科学家认为亚磷酸盐具备作为新型除草剂的开发潜力。相比传统除草剂,亚磷酸盐更廉价且对环境污染更小。本小节总结了

近年来在拟南芥^[52]、水稻、玉米等植物中应用亚磷酸脱氢酶基因的一些研究进展,以期亚磷酸盐开发为一种具备除草剂和筛选标记功能的磷肥提供基础信息(表2)。

表2 亚磷酸脱氢酶基因在植物中的应用
Table 2 Application of phosphite dehydrogenase genes in plants

基因来源	植物种类	目标性状及意义	参考文献
施氏假单胞菌 WM88 (<i>Pseudomonas</i> sp. WM88)	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	转基因模式植物能代谢亚磷酸盐,为后续开发亚磷酸盐作为除草剂提供基础	[52-53]
施氏假单胞菌 WM88	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	转基因模式植物代谢亚磷酸盐,将亚磷酸盐作为新的磷源	[52]
施氏假单胞菌 WM88	棉花 (<i>Gossypium</i> spp.)	建立 ptxD/Phi 筛选体系,作为除草剂	[54]
施氏假单胞菌 WM88	油菜 (<i>Brassica napus</i>)	使其代谢亚磷酸盐,为后续油菜利用亚磷酸盐作为磷肥奠定基础	[55]
罗尔斯通菌 4506 (<i>Ralstonia</i> 4506)	水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	作为筛选标记基因,增加了筛选效率,而且降低了对自然的安全隐患	[2]
施氏假单胞菌 WM88	玉米 (<i>Zea mays</i>)	建立 ptxD/Phi 选择标记系统,虽然转基因玉米能代谢亚磷酸盐,但愈伤组织的转化频率不高,后续需要对例如亚磷酸盐浓度等进行改进	[56]

2.2.1 亚磷酸脱氢酶基因在拟南芥中的应用 拟南芥是科研人员最常用的模式植物之一。2012年,有研究者将来自于施氏假单胞菌 WM88 的亚磷酸脱氢酶基因转入拟南芥中,并将其与野生型拟南芥放在以亚磷酸盐为唯一磷源的琼脂培养基中进行培养,转基因拟南芥生长旺盛长出发达的根系而野生型拟南芥生长受到抑制,没有或有较少侧根。为了进一步确定转基因植物能有效利用亚磷酸盐,研究者在温室土壤中添加磷酸盐或亚磷酸盐,发现在亚磷酸盐土壤中培养的转基因拟南芥生长旺盛,与施用正磷酸盐的转基因拟南芥以及野生型拟南芥并无明显差别;而施用亚磷酸盐的野生型拟南芥生长受到抑制,甚至死亡,而且给转基因植物施用的亚磷酸盐含量要比野生型植物减少大约 30%~50%^[1,52]。该研究证明转亚磷酸脱氢酶基因的拟南芥能够分解亚磷酸盐将其作为磷源,不仅能缓解磷源匮乏的问题,还能将亚磷酸盐作为除草剂消除杂草。

2021 年, Liu 等^[53]对罗尔斯通菌株中的亚磷酸脱氢酶进行密码子优化,并将其转入拟南芥中获得转基因材料。研究人员使用含有低磷、高磷和亚磷酸盐的 MS 培养基培养野生型和转基因的拟南芥种子,观察生长表型。结果显示,在低磷和高磷的培养基中,转基因拟南芥的生长表型与野

生型相似;在含有亚磷酸盐的培养基中,转基因拟南芥可以正常生长,而野生型植株的生长受到抑制。为了进一步验证,研究人员还探究了开花时间和种子产量。在缺磷条件下,野生型植株和转基因植株的开花时间延迟,种子产量减少,表现出相似的特征;在亚磷酸盐为唯一磷源的条件,转基因植株的开花时间和种子产量与正常磷水平下的情况相似,而野生型植株的开花受到抑制,无法产生种子^[53]。上述研究证明了转亚磷酸脱氢酶基因的拟南芥能够将亚磷酸盐作为磷源,而野生型植株则不能,且亚磷酸盐有抑制植物生长的特点,也为后续开发亚磷酸盐作为除草剂提供了基础。

2.2.2 亚磷酸脱氢酶基因在烟草中的应用 烟草与拟南芥一样,也是科研人员常用的模式植物。在 2013 年的一项研究中, Lo’pez-Arredondo 和 Herrera-Estrella^[52]利用具有组成型表达能力的花椰菜花叶病毒 35S 启动子创建了转亚磷酸脱氢酶基因的烟草,并与野生型材料分别放置在含有磷酸盐或亚磷酸盐的土壤中进行培养。实验结果显示,未施用磷肥时,均生长较差;施用亚磷酸盐,转基因烟草生长旺盛,与施用磷酸盐的植株表现相似,而施用亚磷酸盐的野生型烟草生长受到抑制,并最终死亡。测定光合速率时,发现在施用亚磷酸盐和磷酸盐时,转基因植株与施用磷酸盐的野生型

植株相近,由于磷是合成叶绿素所必需的重要元素,缺乏磷会导致植物的光合速率降低,这也证明转基因烟草能够代谢亚磷酸。该研究还对施用亚磷酸盐的转基因烟草花、叶和果实进行亚磷酸含量测定,结果均低于检测水平($<0.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$),且仅有磷酸盐,证明了转基因烟草能将亚磷酸代谢为磷酸进行利用。该试验不仅说明了转亚磷酸脱氢酶的植株能将亚磷酸作为磷源,也说明了亚磷酸盐有抑制植物生长甚至致死的特点。

2.2.3 亚磷酸脱氢酶基因在棉花中的应用 棉花是重要的经济作物。Pandeya等^[54]将来自于施氏假单胞菌WM88中的亚磷酸脱氢酶基因导入棉花中获得转基因棉花,并建立了ptxD/Phi体系。对转基因植株和野生型植株分别施用以磷酸盐或亚磷酸盐为唯一磷源的霍格兰培养液。在以磷酸盐为唯一磷源的培养条件下,两种植株生长状况接近;在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养条件下,野生型植株相比于转基因植株高度显著降低,并且总生物量减少约7倍。

在农业生产上棉花的产量也会受到杂草的干扰,该试验也验证了亚磷酸盐能抑制杂草。将转基因植株和多种杂草共同种植,例如阔叶杂草和禾类杂草与转基因棉花进行竞争试验。在不施用磷条件下,均受到抑制;在施用磷的条件下,阔叶杂草生长迅速,远超转基因棉花;在施用以亚磷酸盐为唯一磷源条件下,转基因棉花的生长状况明显优于杂草,杂草开始时表现为叶片损伤,6周后尤为严重。该试验证明转基因棉花能够将亚磷酸盐代谢为磷酸盐,自身生长不受抑制的同时还达到了抑制杂草的目的。

2.2.4 亚磷酸脱氢酶基因在甘蓝型油菜中的应用 甘蓝型油菜是重要的油料作物之一^[57]。熊腾^[55]通过组织培养等方法将来自施氏假单胞菌WM88中的ptxD导入到甘蓝型油菜中获得了转基因油菜。设置从 $100 \sim 400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚磷酸盐浓度用于喷施野生型棉花用 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚磷酸盐培养转基因油菜和野生型油菜幼苗,发现野生型油菜叶片逐渐变黄,而转基因油菜正常生长;同时,用等浓度的亚磷酸盐溶液喷施转基因油菜、野生型油菜以及杂草,发现转基因油菜正常生长,而野生型油菜以及杂草叶片逐渐变黄甚至死亡,得出 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚磷酸盐为植株半致死量。由此可见,转基因油菜不仅可以利用亚磷酸盐作为磷

源,而且可以有效除杂草,为后续油菜利用亚磷酸盐作为磷肥奠定了一定的基础。

2.2.5 亚磷酸脱氢酶基因在水稻中的应用 水稻^[58]是主要的粮食作物之一。刘同同等^[2]对Hirota等从罗尔斯通菌4506中获得的亚磷酸脱氢酶基因进行密码子优化,获得了活性更好的亚磷酸脱氢酶基因PhiQ,利用农杆菌介导法获得了转基因水稻。用含磷酸盐 and 不同浓度亚磷酸盐的培养基处理野生型愈伤组织和转基因愈伤组织。结果表明,在正常磷酸盐处理的培养基中,均能正常生长且无明显区别;在不同浓度的亚磷酸盐处理的培养基中,野生型植株生长受到抑制,并发生褐化,而转基因植株在不同浓度的亚磷酸盐处理下均能正常生长,且愈伤组织的平均质量明显高于野生型。并且通过叶面喷施亚磷酸盐,建立了一套水稻的筛选标记基因遗传转化体系。当以ptxDQ基因作为筛选标记基因时,植物的抗性愈伤筛选效率显著高于草铵膦以及潮霉素等抗性基因的筛选效率,大约为44.37%~47.28%。该实验建立的水稻遗传转化体系,以亚磷酸盐作为筛选剂,亚磷酸脱氢酶基因作为筛选标记基因,不仅增加了筛选效率,而且降低了对自然的安全隐患,能为目前转基因作物研究中现存的问题提供一些解决思路。

2.2.6 亚磷酸脱氢酶基因在玉米中的应用 玉米是重要的粮食和饲料作物^[53]。Nahampun等^[56]将亚磷酸脱氢酶基因通过农杆菌介导的遗传转化导入玉米B104自交系以及Hi II杂交基因型当中,作为筛选标记,在此之前玉米B104自交系以及Hi II杂交基因型已被证明能用于农杆菌介导的遗传转化^[59-61]。该试验建立了一个ptxD/Phi体系,对植物材料在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基上进行培养,并与标准除草剂bar/双丙氨膦选择系统比较愈伤组织的转化频率。结果表明,双丙氨膦选择系统转化频率平均值为 $(3.7 \pm 1.1)\%$,约是亚磷酸盐选择系统的2~4倍,虽然转化频率不高,但两品种转基因材料的愈伤组织的特征和形态与丙氨膦选择系统大致相同,也证明了能够表达亚磷酸脱氢酶的植物细胞能代谢亚磷酸盐,而非转化细胞则不能。期待后续实验对例如亚磷酸盐浓度做进一步改进使ptxD/Phi选择系统可作为植物转化的正选择标记系统。

3 展望

本文以枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒状杆菌为例,阐述了亚磷酸脱氢酶在微生物利用中的使用方法和应用效果。通过感受态细胞转化的方法,可以构建表达外源亚磷酸脱氢酶基因的基因工程微生物,利用亚磷酸盐的杀菌特性,基因工程微生物可以在非灭菌环境下进行高效发酵,这种新型发酵系统简化了发酵过程,降低了工业微生物的能耗和成本。单细胞藻类研究结果表明,利用亚磷酸脱氢酶基因改造单细胞真核生物可以将亚磷酸盐代谢为磷酸盐,在以亚磷酸盐为唯一磷源的培养基筛选阳性菌落。在植物方面,本文总结了亚磷酸脱氢酶在模式植物拟南芥、烟草,经济作物棉花、油菜,以及粮食作物水稻和玉米中的应用进展。在模式植物中,转基因拟南芥通过过量表达外源亚磷酸脱氢酶基因可以有效分解亚磷酸盐作为磷源,缓解磷源匮乏的问题。在经济作物中,研究发现转亚磷酸脱氢酶编码基因作物在喷施亚磷酸盐后不会影响自身生长,因此可以作为除草剂使用。而在粮食作物中,水稻和玉米已经被发现可以利用亚磷酸脱氢酶将亚磷酸盐分解为磷酸盐,因此可以作为遗传转化中阳性材料的筛选标记。与传统除草剂等相比,亚磷酸盐具有环保、成本低、稳定性佳等优势。然而,是否可以将其作为田间除草剂兼顾肥料使用还需要进一步研究。

整体上看,目前亚磷酸脱氢酶在植物和微生物中的应用研究还相对较少,且仅仅停留在功能解析和概念验证阶段,对于亚磷酸脱氢酶的催化机理、蛋白结构、酶活改良等方面研究不够深入。目前,已经获得的转基因微生物大多都是建立抗菌体系,应用于发酵工程等方面,但是产业化生产如连续发酵暂时不太理想,后续可以从亚磷酸盐浓度或者发酵时间等方面进行改进,增大产业化应用。而已经获得的转基因植物也仅在少数植物中,需要进一步扩大研究范围,可以从目前已报道的植物入手,例如找与其亲缘关系较近的植物物种,优化密码子,找到有关该植物体表达酶活性更好的亚磷酸脱氢酶基因,探索更多植物中亚磷酸脱氢酶的应用潜力。此外,我们发现将亚磷酸脱氢酶基因导入植物中也面临一些挑战,如基因传递效率和稳定性等问题,因此需要进一步改进基

因转化技术,提高基因导入的成功率和稳定性。有趣的是,在不同植物中,过表达亚磷酸脱氢酶产生的应用效果也存在显著差异,如本团队研究发现在玉米中过表达亚磷酸脱氢酶可以代谢亚磷酸盐,并不足以赋予玉米耐除草剂喷施特性(数据未发表),猜测可能是玉米叶片表面对于喷施的亚磷酸盐吸收大于代谢,导致玉米不耐受除草剂,具体机理仍需进一步深入探索。

未来,随着蛋白质定向进化技术、不依赖于基因型的遗传转化和基因编辑技术的快速发展,亚磷酸脱氢酶的酶活改造、不同植物底盘适配、开发高效利用亚磷酸盐的新型基因工程植物等工作必将成为该领域的研究热点。在作物领域,加快亚磷酸盐作为一种兼具除草剂和杀菌剂功能的磷肥推广对于提高作物对有限磷资源的利用效率、缓解土壤中磷素的匮乏问题、提高作物对除草剂的耐受性、减少对环境的污染等同样具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] LÓPEZ-ARREDONDO D L, HERRERA-ESTRELLA L. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system[J]. Nat. Biotechnol., 2012, 30: 889-893.
- [2] 刘同同,刘诗琦,袁丽丽,等. 亚磷酸脱氢酶作为筛选标记基因在水稻遗传转化中的应用[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(2): 98-104.
LIU T T, LIU S Q, YUAN L L, et al. Using phosphite dehydrogenase as a screening marker gene in rice genetic transformation[J]. J. Huazhong Agric. Univ., 2022, 41(2): 98-104.
- [3] GUO Z W, OU X Y, LIANG S, et al. Recruiting a phosphite dehydrogenase/formamidase-driven antimicrobial contamination system in *Bacillus subtilis* for nonsterilized fermentation of acetoin[J]. ACS Synth. Biol., 2020, 9(9): 2537-2545.
- [4] FOSTER T L, WINANS L, HELMS S J. Anaerobic utilization of phosphite and hypophosphite by *Bacillus* sp.[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1978, 35(5): 937-944.
- [5] COSTAS A M, WHITE A K, METCALF W W. Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88[J]. J. Biol. Chem., 2001, 276(20): 17429-17436.
- [6] METCALF W W, WOLFE R S. Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88[J]. J. Bacteriol., 1998, 180(21): 5547-5558.
- [7] BARD A J P. Standard potentials in aqueous solutions[M]. New York: Marcel Dekker, 1985.
- [8] HIROTA R, YAMANE S T, FUJIBUCHI T, et al. Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from *Ralstonia* sp. strain 4506[J]. J. Biosci. Bioeng., 2012, 113(4): 445-450.

- [9] ZOU Y, ZHANG H, BRUNZELLE J S, *et al.* Crystal structures of phosphite dehydrogenase provide insights into nicotinamide co-factor regeneration[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(21): 4263-4270.
- [10] RELYEA H A, VAN DER DONK W A. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase[J]. *Bioorg. Chem.*, 2005, 33(3): 171-189.
- [11] 张向楠. 亚磷酸脱氢酶的体外定向进化及其固定化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [12] VRTIS J M, WHITE A K, METCALF W W, *et al.* Phosphite dehydrogenase: an unusual phosphoryl transfer reaction[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123(11): 2672-2673.
- [13] MORTON S C, GLINDEMANN D, WANG X, *et al.* Analysis of reduced phosphorus in samples of environmental interest[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(12): 4369-4376.
- [14] PASEK M A. Rethinking early earth phosphorus geochemistry[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(3): 853-858.
- [15] WHITE A K, METCALF W W. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds[J]. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007, 61: 379-400.
- [16] STONE B L, WHITE A K. Most probable number quantification of hypophosphite and phosphite oxidizing bacteria in natural aquatic and terrestrial environments[J]. *Arch. Microbiol.*, 2012, 194(3): 223-228.
- [17] ADAMS F, CONRAD J P. Transition of phosphite to phosphate in soils[J]. *Soil Sci.*, 1953, 75(5): 361-371.
- [18] CASIDA L E. Microbial oxidation and utilization of orthophosphite during growth[J]. *J. Bacteriol.*, 1960, 80: 237-241.
- [19] MALACINSKI G, KONETZKA W A. Bacterial oxidation of orthophosphate[J]. *J. Bacteriol.*, 1966, 91(2): 578-582.
- [20] YANG K, METCALF W W. A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(21): 7919-7924.
- [21] MCDONALD A, GRANT B, PLAXTON W. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response[J]. *J. Plant Nutr.*, 2001, 24(10): 1505-1519.
- [22] LEI M, PENG X, SUN W, *et al.* Nonsterile L-lysine fermentation using engineered phosphite-grown *Corynebacterium glutamicum*[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(15): 10160-10167.
- [23] SANDOVAL-VARGAS J M, JIMÉNEZ-CLEMENTE L A, MACEDO-OSORIO K S, *et al.* Use of the ptxD gene as a portable selectable marker for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2019, 61(6): 461-468.
- [24] CUTOLO E, TOSONI M, BARERA S, *et al.* A phosphite dehydrogenase variant with promiscuous access to nicotinamide co-factor pools sustains fast phosphite-dependent growth of transplastomic *Chlamydomonas reinhardtii*[J/OL]. *Plants*, 2020, 9(4): 473[2024-01-04]. <https://doi.org/10.3390/plants9040473>.
- [25] JIANG X R, YAO Z H, CHEN G Q. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas*[J]. *Metab. Eng.*, 2017, 44: 30-37.
- [26] XIAO Z, GU R, HOU X, *et al.* Non-sterilized fermentative production of acetoin with 2, 3-butanediol as a main byproduct from maize hydrolysate by a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain[J]. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2017, 92(11): 2845-2852.
- [27] YE J, HU D, CHE X, *et al.* Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. *Metab. Eng.*, 2018, 47: 143-152.
- [28] CJOO Y, KO Y J, YOU S K, *et al.* Creating a new pathway in *Corynebacterium glutamicum* for the production of taurine as a food additive[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2018, 66(51): 13454-13463.
- [29] WENDISCH V F, JORGE J M P, PÉREZ-GARCÍA F, *et al.* Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*[J/OL]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 32(6): 105[2024-01-22]. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2060-1>.
- [30] BECKER J, WITTMANN C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23(5): 718-726.
- [31] BECKER J, WITTMANN C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23(4): 631-640.
- [32] HARRIS E H. *Chlamydomonas* as a model organism[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2001, 52: 363-406.
- [33] RASALA B A, MAYFIELD S P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses[J]. *Photosynth. Res.*, 2015, 123(3): 227-239.
- [34] SCRANTON M A, OSTRAND J T, FIELDS F J, *et al.* *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production[J]. *Plant J.*, 2015, 82(3): 523-531.
- [35] ALMARAZ-DELGADO A L, FLORES-URIBE J, PÉREZ-ESPAÑA V H, *et al.* Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J/OL]. *AMB Express*, 2014, 4: 57[2024-01-22]. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0057-4>.
- [36] DYU Y M, PURTON S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins[J]. *Microbiol. Read.*, 2018, 164(2): 113-121.
- [37] SCAIFE M A, NGUYEN G T D T, RICO J, *et al.* Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host[J]. *Plant J.*, 2015, 82(3): 532-546.
- [38] DOMINGUES S J, MELO F R, AGUIAR J M, *et al.* Resistance of *Vigna unguiculata* (cowpea) seeds to *Callosobruchus maculatus* is restricted to cotyledonary tissues[J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, 86(12): 1977-1985.
- [39] OUIMETTE D. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana*) seedlings and soil following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate[J/OL]. *Plant Dis.*, 1989, 73(3): 212-215.
- [40] CARSWELL C, GRANT B R, THEODOROU M E, *et al.* The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings[J]. *Plant Physiol.*, 1996, 110(1): 105-110.

- [41] CARSWELL M C, GRANT B R, PLAXTON W C. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate[J]. *Planta*, 1997, 203(1): 67-74.
- [42] FÖRSTER H, ADASKAVEG J E, KIM D H, *et al.* Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture[J]. *Plant Dis.*, 1998, 82(10): 1165-1170.
- [43] TICCONI C, DELATORRE C, ABEL S. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2001, 127(3): 963-972.
- [44] VARADARAJAN D K, KARTHIKEYAN A S, MATILDA P D, *et al.* Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 129(3): 1232-1240.
- [45] HEAP I, HEAP I, HEAP J T, *et al.* The international survey of herbicide resistant weeds[J]. *Weed Technol.*, 2006, 4: 220-220.
- [46] BLOCK M D, BOTTERMAN J, VANDEWIELE M, *et al.* Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme[J]. *EMBO J.*, 1987, 6(9): 2513-2518.
- [47] VAN DEN ELZEN P J M, TOWNSEND J, LEE K Y, *et al.* A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1985, 5(5): 299-302.
- [48] ACHARY V M M, RAM B, MANNA M, *et al.* Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(12): 1493-1508.
- [49] GORDON-KAMM W J, SPENCER T M, MANGANO M L, *et al.* Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants[J]. *Plant Cell*, 1990, 2(7): 603-618.
- [50] PRICE J A, BALKCOM S K, CULPEPPER A S, *et al.* Glyphosate-resistant *Palmer amaranth*: a threat to conservation tillage[J]. *J. Soil Water Conserv.*, 2011, 66(4): 265-275.
- [51] DILLON A, VARANASI V K, DANILOVA T V, *et al.* Physical mapping of amplified copies of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*[J]. *Plant Physiol.*, 2017, 173(2): 1226-1234.
- [52] LÓPEZ-ARREDONDO D L, HERRERA-ESTRELLA L. A novel dominant selectable system for the selection of transgenic plants under *in vitro* and greenhouse conditions based on phosphite metabolism[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, 11(4): 516-525.
- [53] LIU L, GALLAGHER J, AREVALO E D, *et al.* Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize CLE genes[J]. *Nat. Plants*, 2021, 7: 287-294.
- [54] PANDEYA D, LÓPEZ-ARREDONDO D L, JANGA M R, *et al.* Selective fertilization with phosphite allows unhindered growth of cotton plants expressing the *ptxD* gene while suppressing weeds[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, 115(29): 6946-6955.
- [55] 熊腾. 亚磷酸盐脱氢酶基因 *ptxD* 转化甘蓝型油菜的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
XIONG T. Transformation of *Brassica napus* by phosphite dehydrogenase gene *ptxD*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020.
- [56] NAHAMPUN H N, LÓPEZ-ARREDONDO D, XU X, *et al.* Assessment of *ptxD* gene as an alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated maize transformation[J]. *Plant Cell Rep.*, 2016, 35(5): 1121-1132.
- [57] 陆红臣, 仵汉飞, 文静, 等. 甘蓝型油菜多主花序性状的表型特点与遗传分析[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(6): 850-857.
LU H C, WU H F, WEN J, *et al.* Phenotypic characteristics and genetic analysis of multi-inflorescence trait in *Brassica napus*[J]. *Chin. J. Oil Crop Sci.*, 2019, 41(6): 850-857.
- [58] 徐文晖. 水稻生长的生育特点与病虫害防治分析[J]. *智慧农业导刊*, 2022, 2(5): 67-69.
- [59] FRAME B R, SHOU H, CHIKWAMBA R K, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 129(1): 13-22.
- [60] FRAME B R, MCMURRAY J M, FONGER T M, *et al.* Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts[J]. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(10): 1024-1034.
- [61] ZHAO Z Y, GU W, CAI T, *et al.* High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize[J]. *Mol. Breed.*, 2002, 8(4): 323-333.