

刘 强, 张丽媛, 马红丹, 等. 转 *phyA* 基因玉米新种质的创制[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 43-48.

转 *phyA* 基因玉米新种质的创制

刘 强, 张丽媛, 马红丹, 赵邯郸, 袁文娅, 刘思言, 关淑艳

(吉林农业大学 生物技术中心, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】构建植酸酶基因(*phyA*) 根部特异表达的重组植物表达载体, 并利用其创制磷高效利用的玉米新种质. 【方法】通过 PCR 方法从携带 *phyA* 的表达载体 pCAMBIA3301 中扩增出 *phyA* 表达元件 ZmGLU1P-*phyA*-Nos, 并将其插入到带有耐盐基因的中间载体 pCAMBIA1301-BADH 上, 获得 *phyA* 根特异表达的植物表达载体: pCAM-BIA1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos, 通过农杆菌介导法转化玉米胚性愈伤组织, 并对再生植株进行分子生物学检测分析. 【结果和结论】经 PCR 检测获得了 9 株 T₀ 代阳性植株; T₁ 代植株的抗盐筛选、PCR 检测、Southern 杂交检测及 RT-PCR 检测证明了 *phyA* 已经整合到玉米基因组中, 获得 6 株 T₁ 代阳性植株; T₂ 代植株的 RT-PCR 及根组织的酶活性测定结果表明, *phyA* 在转基因植株根部大量表达, 植酸酶活性平均比对照植株提高了 10.9 倍, 活性最高的达到 5.432 U/g. 植酸酶基因在转基因植株根部大量特异表达, 获得了转 *phyA* 的玉米新种质, 为创制磷高效利用的玉米新种质、提高玉米的产量奠定了基础.

关键词: 玉米; 植酸酶基因; 表达载体构建; 新种质
中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2014)01-0043-06

Development of corn new germplasm with transgenic *phyA*

LIU Qiang, ZHANG Liyuan, MA Hongdan, ZHAO Handan, YUAN Wenya, LIU Siyan, GUAN Shuyan
(Biotechnology Center, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】To construct the vector of phytase gene(*phyA*) specific expression in roots and to develop transgenic maize with high phosphorus efficiency. 【Method】Using PCR method, the expression cassette ZmGLU1P-*phyA*-Nos was constructed by amplifying *phyA* from its expression vector pCAMBIA3301. The expression cassette was inserted into the transitional vector pCAMBIA1301-BADH with salt-tolerance *BADH* gene, which formed pCAMBIA1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos, the expression vector of *phyA* specific expression in roots. The *phyA* was transformed into maize embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. The regeneration plants were detected by molecular biology techniques. 【Result and conclusion】The transformed plants were detected by PCR and 9 transgenic lines were obtained. Through salt-resistant selection, PCR, Southern blotting and RT-PCR analysis of T₁ generation plants, the results showed that *phyA* were successfully integrated into the maize genome and 6 transgenic lines were obtained. The analysis of phytase activity in maize plant root of T₂ generation plants showed that the phytase was able to be expressed highly and secreted from roots. The phytase activity of transformed plants increased 10.9 times on average, with the highest phytase activity being 5.432U/g.

收稿日期: 2013-02-05 优先出版时间: 2013-11-07
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1501.008.html>
作者简介: 刘 强(1985—), 男, 硕士, E-mail: liuqiang54335@163.com; 通信作者: 关淑艳(1971—), 女, 教授, 博士, E-mail: guanshuyan@yahoo.com.cn
基金项目: 国家转基因专项(20112x11003-005); 吉林省科技发展计划项目(20120215); 吉林农业大学校内启动基金(201242); 国家农业科技成果转化资金项目(20BG2B100125)

The new corn germplasm with transgenic phytase was obtained. Moreover, this study could lay a foundation for creation of new corn germplasm with high phosphorus efficiency and high maize yield.

Key words:maize; *phyA*; construction of expression vector; new germplasm

土壤有机磷是植物生长所需磷素的一个重要供给源^[1],土壤中含 20%~50% 的有机磷,其中一半左右以植酸盐的形式存在^[2],不能被植物直接利用,只有被特定酶水解为无机磷之后才能被作物吸收利用^[3].在我国,严重缺磷(速效磷在 5 mg/L 以下)的土壤占总耕地的 40% 左右,因此为了满足作物生长的营养需求,每年在作物生长季节需施加大量磷肥,但研究表明,磷肥当季的利用率较低,仅为 20%~40%^[4],因此,高效活化、利用土壤磷库中的磷是十分重要的.

植酸酶(Phytase)是催化植酸及其盐类水解为肌醇与磷酸(盐)的一类酶的总称,是一类特殊的酸性磷酸酶,可通过水解植酸释放出无机磷^[5].自然条件下,植物根系能分泌有机酸和少量磷酸酯酶(主要是植酸酶),促使土壤有机态磷溶解,释放出无机磷供植株吸收利用,但植物以这种方式利用土壤中磷资源的能力很弱,磷素的利用率很低.随着科学技术的发展,转基因技术成为解决这一难题的新途径,但目前就这一问题的研究主要以烟草和拟南芥等模式植物为对象^[6],对主要农作物的研究较少.玉米可应用于饲料加工、工业生产等诸多领域,然而土壤缺磷影响了玉米的生长,阻碍了玉米产业的发展,如果通过基因工程手段将玉米利用土壤磷素的能力加以提高,将会改善玉米的生长状态,提高玉米的产量,这对我国玉米产业的发展有着重大的意义.因此,本研究利用转基因技术将 *phyA* 转入玉米自交系中,并使其在玉米根部特异表达,大大提高植酸酶的活性,以期降解土壤中的有机磷,提高玉米对磷的吸收能力,获得具有高效降解植酸盐能力,且耐盐碱的磷高效利用的玉米新种质,为提高玉米产量打下坚实的基础.

1 材料与方法

1.1 试验所用材料和试剂

玉米自交系 H99 的胚性愈伤组织,由吉林农业大学生物技术中心提供.基础质粒 pCambia1301-BADH(已去除潮霉素基因)和改造的植物表达载体;pCambia3301(携带玉米根部特异启动子特异启动的植酸酶基因表达元件;ZmGLU1P-*phyA*-Nos,其中 *phyA* 基因来源于黑曲霉)均由吉林农业大学生物技术中心实验室提供.菌株 *Escherichia coli* DH5 α 、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 均由本实验室保存并提供.培养农杆菌、大肠埃希菌的 YEP、LB 培养基,玉米遗传转化的 N6、MS 培养基,制作方法见文献[7].PCR 扩增试剂、DNA Marker、限制性内切酶均购自 MBI 公司;Total RNA Extraction Kit 试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 重组植物表达载体的构建 以基础表达载体 pCambia3301 为模板,设计用于扩增 *phyA* 表达元件的特异引物: P1: 5'-TTTGGTACCATGTATGC-CTCTGCAATGG-3'; P2: 5'-TTTGGTACCGATCTAGTA-ACATAGATGACACCG-3'(划线处为 *Kpn* I 多克隆位点).采用 Long PCR Enzyme Mix 进行 PCR 扩增得到 *phyA* 表达元件(3 602 bp):ZmGLU1P-*phyA*-Nos.反应体系(50 μ L): 10 $\times$ Long PCR Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 10 μ L, dNTP Mix 4 μ L, P1 1 μ L, P2 1 μ L, 模板 2 μ L, Long PCR Enzyme Mix 0.5 μ L, dd H₂O 31.5 μ L.反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.将完整的表达元件插入到中间载体 pCambia1301-BADH 的 *Kpn* I 处,构建成以抗旱耐盐基因 *BADH* 为筛选标记的安全型重组植物表达载体: pCambia1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos(图 1).

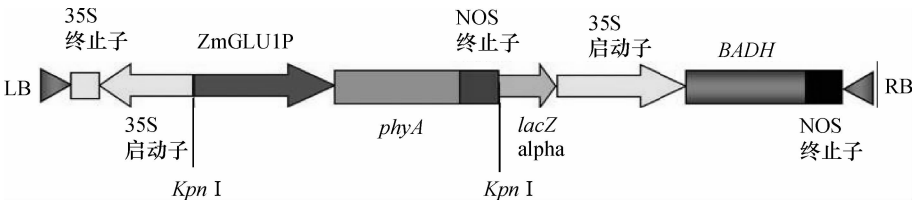


图 1 重组质粒 pCambia1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos 的 T-DNA 区结构图

Fig. 1 The structure map of T-DNA region of expression vector pCambia1301-ZmGLU1P-*phyA*-No

1.2.2 农杆菌介导的玉米遗传转化 参照关淑艳等^[7]的方法进行试验.

1.2.3 转基因植株的 PCR 检测及 Southern 杂交检测 采用改良 CTAB 法^[8]提取转化与未转化植株的叶片基因组 DNA. 以 *phyA* 核苷酸序列 (GenBank 登录号: Z16414.1) 设计特异性引物 (P3: 5'-ATGGGCGTCTCTGCTGTTCT-3'; P4: 5'-GCTAAGCAAAA-CACTCCGCCC-3'), 以基因组作为模板进行 PCR 检测. 25 μ L PCR 反应体系: ddH₂O 17.0 μ L, 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.8 μ L, P3 (25 pmol/L) 0.5 μ L, P4 (25 pmol/L) 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L (约 20 ng/ μ L), *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L. PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 55 s, 57 $^{\circ}$ C 55 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 共 32 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min.

选取经初步检测为阳性的转化植株, 采用 CTAB 大量提取法提取其叶片基因组 DNA, 以纯化的 *phyA* 为模板制备探针, 进行 Southern 杂交检测. 利用 *Hind* III 酶过夜酶切植株基因组 DNA 10 ~ 15 μ g, 利用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行分离, 然后进行转膜、固定及杂交. 其他步骤均按照 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 所述方法进行.

1.2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测 随机选取经初步检测为阳性的转基因植株, 以未转化植株为对照, 利用 Total RNA Extraction Kit 试剂盒提取其根组织的总 RNA, 以反转录的 cDNA 第一条链为模板, 以引

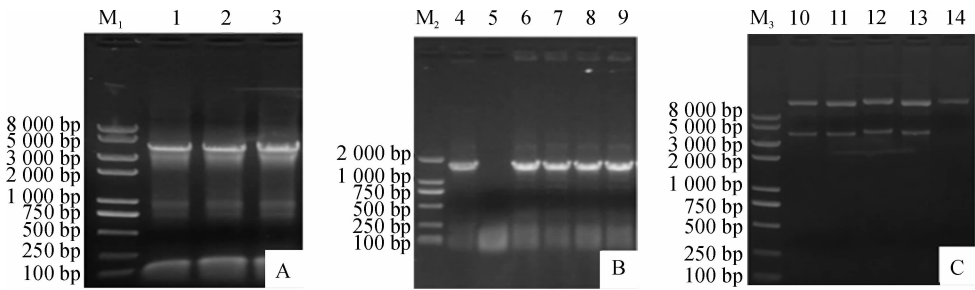
物 P3、P4 扩增 *phyA*, 同时以玉米 *EF-1a* 基因作为内标进行扩增. *EF-1a* 基因引物: P5: 5'-GCTTCACGTC-CCAGGTCATC-3'; P6: 5'-TAGGCTTGGTGGGTAT-CATC-3'^[9], 扩增片段长度为 213 bp, PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

1.2.5 转基因植株根组织植酸酶活性的检测 参照文献^[10]绘制磷标准曲线. 转化植株根组织植酸酶测定中酶液的制备^[11]: 取经检测为阳性的 T₂ 代植株 (未转化植株为对照) 的根系 2 g, 研磨至匀浆, 加入提取液 (0.25 mol/L 乙酸钠, 0.05% TritonX-100, 0.05% 牛血清白蛋白) 8.0 mL, 超声 15 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡 15 min, 离心得样品提取液. 植酸酶活性测定: 设 3 组平行试验, 方法参考文献^[12]. 根组织植酸酶酶活性单位定义为: 在 37 $^{\circ}$ C、pH 5.5 条件下, 每分钟从 0.10 mmol/L 的植酸钠溶液中释放 1 μ mol 的无机磷所需要的酶量为 1 个酶活力单位, 记为 (U), 酶活力单位以 U/g 表示.

2 结果与分析

2.1 重组植物表达载体的构建及鉴定

以基础载体 pCambia3301 为模板, 以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增, 得到 *phyA* 表达元件 (图 2A). 经 *Kpn* I 限制性单酶切, 将表达元件插入到中间载体 pCambia1301 的 *Kpn* I 处. 转化大肠埃希菌, 获得重组子, 分别进行 PCR、酶切鉴定及序列测序鉴定.



A: *phyA* 表达元件的 PCR 扩增, M₁: DNA marker DL2000 Plus II, 1 ~ 3: 载体 pCambia3301 PCR 产物; B: 重组子的 PCR 鉴定, M₂: DNA marker DL2000, 4: 携带 *phyA* 的质粒 pCambia3301, 5: 中间载体 pCambia1301, 6 ~ 9: 重组质粒; C: 重组质粒的酶切鉴定, M₃: DNA marker DL2000 Plus II, 10 ~ 13: 重组质粒, 14: 中间载体 pCambia1301.

图 2 *phyA* 重组植物表达载体的构建及鉴定

Fig. 2 Construction and identification of expression vector of *phyA* in the recombinant plant

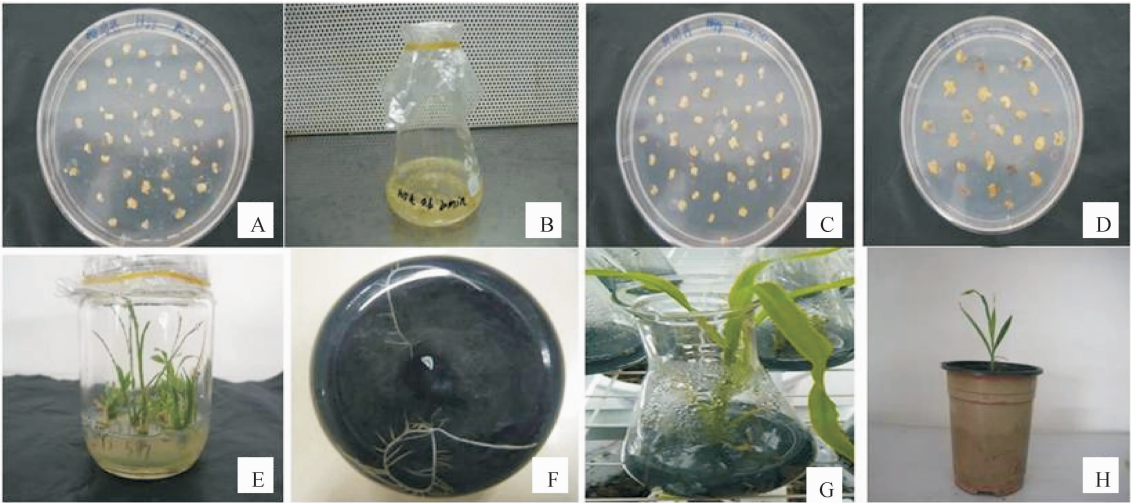
如图 2B 所示, PCR 扩增出约 1 506 bp 的条带, 与表达元件中 *phyA* 片段大小吻合; 经 *Kpn* I 单酶切, 得到 2 条带, 一条约 3 602 bp 与 *phyA* 表达元件大小吻合, 一条与中间载体 PCMBIA1301 大小吻合 (图 2C), 初步证明目的片段插入正确. 为了进一步证实

重组质粒的正确性, 对 *phyA* 片段 (1 506 bp) 测序, 测序结果与 GenBank 中 *phyA* (登录号: Z16414.1) 序列相似性为 99.5%, 同时进行氨基酸序列比对, 与其相似性为 100%, 故重组植物表达载体 pCambia1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos 构建成功.

2.2 农杆菌介导的玉米转化植株的获得

利用农杆菌介导法将重组质粒:pCAMBIA1301-ZmGLU1P-*phyA*-Nos 导入受体材料,经 NaCl 溶液筛

选后获得抗性再生植株(图 3),然后对转化植株进行检测.



A:愈伤组织预培养;B:农杆菌侵染;C:共培养;D:NaCl 筛选培养;E:分化培养;F:生根培养;G:炼苗;H:再生植株.

图 3 农杆菌介导的玉米愈伤组织遗传转化

Fig. 3 Transformation of maize embryogenic callus by *Agrobacterium tumefaciens* mediated

2.3 转基因植株的 PCR 检测及 Southern 杂交检测

以转化植株幼嫩叶片的基因组 DNA 为模板,以特异性引物 P3、P4 进行 PCR 检测,以携带 *phyA* 的质粒 DNA 作阳性对照,未转化植株作阴性对照. 由图 4 可知,部分转化植株扩增出了与阳性对照在同一位置的特异性条带,而非转基因植株没有,初步证明 *phyA* 基因成功地转入到受体中. 初步获得 9 株 T_0 代阳性植株(编号: T_0 -1 ~ T_0 -9),收获 T_0 代种子 125 粒,10 株 T_1 代阳性植株,其中 4 株来自 T_0 -3,编号: T_1 -3-1 ~ T_1 -3-4,6 株来自 T_0 -5,编号: T_1 -5-1 ~ T_1 -5-6. 收获 T_1 代种子 155 粒,获得 16 株 T_2 代阳性植株,其中 5 株来自 T_1 -3-1;6 株来自 T_1 -5-2;5 株来自 T_1 -5-3,并分别编号.

选取经 PCR 检测为阳性的 T_1 代转基因植株,对

其进行 *phyA* Southern 杂交分析. 其中以携带 *phyA* 的质粒 DNA 作阳性对照,未转化的植株作阴性对照. 由图 5 可见,有 6 株 PCR 检测为阳性并测序正确的单株有杂交带出现,未转化植株没有杂交信号出现,进一步证明外源 *phyA* 已整合到这 6 株 T_1 代转基因玉米基因组中,且均为单拷贝整合.

2.4 转基因株系的 RT-PCR 检测

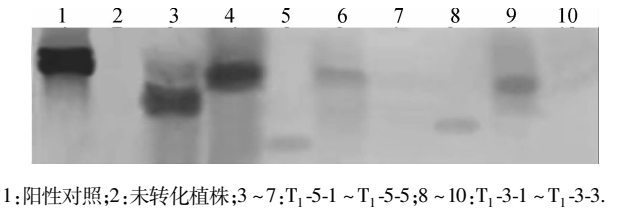
以部分阳性植株根部总 RNA 转录的 cDNA 为模板,以 *phyA* 特异引物进行 RT-PCR 检测,同时以玉米 *EF-1a* 为内标基因做同样循环数的 PCR. 如图 6 所示,转基因植株扩增得到 *phyA* 和 *EF-1a* 目的条带,而未转化植株只扩增出 *EF-1a* 目的产物,从而证明外源 *phyA* 在转基因植株根部已成功转录.



A: T_0 代转化植株 *phyA* 基因的 PCR 检测, M_1 :DNA marker DL2000,1:未转化植株,2 ~ 10:转化植株,11:阳性对照;B: T_1 代转化植株 *phyA* 基因的 PCR 检测, M_2 :DNA marker DL2000,2:阳性对照,13:非转化植株,14 ~ 125:转化植株;C: T_2 代转化植株 *phyA* 基因的 PCR 检测, M_3 :DNA marker DL2000,26:非转化植株,27:阳性对照,28 ~ 41:转化植株.

图 4 转化植株 *phyA* 的 PCR 检测

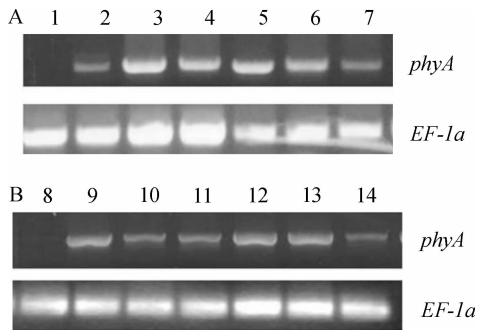
Fig. 4 PCR detection of transgenic plants with *phyA*



1:阳性对照;2:未转化植株;3~7; T_1 -5-1~ T_1 -5-5;8~10; T_1 -3-1~ T_1 -3-3.

图5 转化植株的 Southern 杂交分析

Fig.5 Southern blot analysis of transgenic plants



A: T_1 代转基因植株的 RT-PCR 检测,1:未转化植株,2~7: T_1 代 Southern 杂交阳性植株;B: T_2 代转基因植株的 RT-PCR 检测,8:未转化植株,9~14: T_2 代 PCR 阳性植株.

图6 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig.6 RT-PCR analysis of transgenic plants

2.5 T_2 代转基因植株根组织植酸酶活性的检测

选取 PCR 检测为阳性的 T_2 代植株(未转化植株为对照)进行根系植酸酶活性的测定,分析结果(表1)表明, T_2 代转基因植株根系的植酸酶活性与对照相比均有极显著($P < 0.01$)提高,平均提高 10.9 倍,以株系 T_2 -5-2-3 最高,为对照的 17.7 倍.其中,来自于 T_1 -3-1 和 T_1 -5-3 的 10 株 PCR 阳性植株中有 5 株表现出较高的植酸酶活性,而来自 T_1 -5-2 的 6 个株

表 1 T_2 代转基因植株根系植酸酶活性分析¹⁾

Tab.1 Secretary phytase activities from T_2 transgenic plant roots

植株 编号	酶活性 ²⁾ / (U · g ⁻¹)	比值 ³⁾	植株 编号	酶活性 ²⁾ / (U · g ⁻¹)	比值 ³⁾
T_2 -5-2-3	5.432 aA	17.7	T_2 -5-3-3	2.983 gF	9.7
T_2 -5-2-2	4.349 bB	14.2	T_2 -5-2-5	2.374 hG	7.7
T_2 -3-1-2	4.253 cC	13.8	T_2 -5-2-6	2.417 hG	7.8
T_2 -5-2-4	4.172 dD	13.6	T_2 -5-3-5	2.214 iH	7.2
T_2 -5-2-1	3.985 eE	12.9	T_2 -3-1-1	1.510 jI	4.9
T_2 -5-3-2	3.032 fF	9.8	CK	0.307 kJ	—

1) T_2 -5-2-1~ T_2 -5-2-6 来自同一 T_1 代植株 T_1 -5-2; T_2 -5-3-2~ T_2 -5-3-5 来自同一 T_1 代植株 T_1 -5-3; T_2 -3-1-1 和 T_2 -3-1-2 来自同一 T_1 植株 T_1 -3-1.2)数据后凡具有一个相同的大、小写字母分别表示在 $P = 0.01$ 和 $P = 0.05$ 水平上差异不显著(Duncan's 法);3)指转基因植株酶活性与对照酶活性的比值.

系均表现出高植酸酶活性,从而证明 *phyA* 已在转基因植株根部表达,并分泌活性高、能降解植酸盐的植酸酶.获得了能表达高活性植酸酶的 T_2 代转基因玉米植株.

3 讨论与结论

21 世纪以来,转植酸酶基因玉米逐渐进入国人的视线,但多数研究^[13-14]均致力于饲料生产领域,其中最具代表性的是范云六院士培育的第 2 代植酸酶产品,它可直接用于饲料加工,并已于 2009 年获得安全生产证书^[15],2010 年他联合奥瑞金种业进行商品化生产^[16].与之相比,本研究则打破了植酸酶基因在饲料领域应用的界限,将 *phyA* 置于玉米根部特异启动子 *ZmGLU1P*^[17]下,成功构建了玉米根部特异表达载体,以 *ZmGLU1P* 特异启动植酸酶基因的表达,使外源植酸酶基因能够在转基因植株根部表达、分泌植酸酶,提高转基因植株利用有机态磷的能力.这与张琪等^[18]的研究相似,但不同的是本研究选用生物安全标记基因甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*)为选择性标记基因^[19],避免了抗生素和除草剂抗性基因在遗传转化中一系列安全问题^[20]的出现,也可提高转基因植株的抗旱、耐盐碱性.

本研究将构建成功的重组植物表达载体导入玉米中,获得转基因玉米植株.分子检测结果表明植酸酶基因已整合到玉米基因组中并稳定遗传. RT-PCR 结果表明 *phyA* 在植株的根组织中进行转录;根部植酸酶酶活性测定试验表明,根组织蛋白提取液中含有植酸酶成分,对植酸钠具有降解作用,这一结果与张琪等^[18]的研究结果一致,但本研究的植酸酶活性偏低,且来自于同一 T_1 植株的后代之间根系的植酸酶活性也存在显著差异,这可能是由于转基因植株尚不纯合而引起的,有待于进一步的研究. Richardson 等^[21]对转植酸酶基因拟南芥的研究结果显示,植酸酶可在信号肽的引导下,分泌至胞外分解利用培养基质中的植酸态磷;李桂兰等^[22-23]在植酸酶基因转化大豆的研究中也有类似的报道.因此,接下来本实验室将对根外分泌的植酸酶及根际土壤中的磷素进行分析,对转植酸酶基因玉米利用土壤磷的效率进行深入研究,同时对所得转植酸酶基因玉米进行自交纯合,与配合力高的自交系进行杂交,创造更高磷利用率的玉米新种质.

本研究成功构建了 *phyA* 根部特异性表达载体: pCAMBIA1301-*ZmGLU1P-phyA-Nos*,并将其成功导入 <http://xuebao.scau.edu.cn>

玉米;得到了9株 T_0 代转化植株、6株 T_1 代阳性植株和11株具有高植酸酶活性的 T_2 代转基因植株,其平均酶活性与对照比,提高了10.9倍,获得了转 $phyA$ 的玉米新材料,为创制磷高效利用的玉米新种质,提高玉米的产量奠定了基础.

参考文献:

- [1] 徐阳春,沈其荣,茆泽圣.长期施用有机肥对土壤及不同粒级中有机磷含量与分配的影响[J].土壤学报,2003,40(4):593-598.
- [2] DALAI R C. Soil organic phosphorus[J]. Adv Agron, 1977,29:83-117.
- [3] SAXENA S N. Phytase activity of plant roots[J]. J Exp Bot, 1964, 15(3):654-658
- [4] 张琪,陈茹梅,杨文竹,等.组成型表达转植酸酶基因($phyA2$)玉米的获得[J].农业生物技术学报,2010,18(4):623-629.
- [5] 赵少华,宇万太,张璐,等.土壤有机磷研究进展[J].应用生态学报,2004,15(11):2189-2194.
- [6] COELLO P, MAUGHAN J P, MENDOZA A, et al. Generation of low phytic acid *Arabidopsis* seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development[J]. Seed Sci Res,2001,11(4):285-291.
- [7] 关淑艳,赵丽娜,刘慧婧,等.农杆菌介导的 $sbe2a$ 基因RNAi载体对玉米遗传转化的研究[J].作物杂志,2011(2):36-40.
- [8] 郑文杰,刘烜,刘伟,等.转基因大豆加工产品的定性PCR检测[J].农业生物技术学报,2003,11(5):467-471.
- [9] SIMON K, MICHAELA L, MARTIJN A H, et al. Molecular and biochemical analysis of the plastidic ADP-glucose transporter (ZmBT1) from *Zea mays*[J]. J Biol Chem, 2007, 282(31):22481-22491
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T18634-2009 饲用植酸酶活性的测定[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [11] 刘娜,李静,柳鸿敏,等.玉米子粒植酸酶活性测定方法研究[J].吉林农业大学学报,2012,34(1):71-75.
- [12] 柳鸿敏.转基因玉米中植酸酶活性检测方法研究[D].长春:吉林大学,2011.
- [13] 胡金杰,占今舜,张彬.植酸酶在环保型饲料的应用[J].粮食与饲料工业,2012(2):51-52.
- [14] 梁欣,于晓丽.植酸酶在家禽饲料中应用的研究进展[J].山东畜牧兽医,2012(4):81-83.
- [15] 佚名.我国自主研发转植酸酶基因玉米获安全认证[J].北方牧业,2009(24):27.
- [16] 佚名.转植酸酶基因玉米与奥瑞金种业联姻[J].北京农业,2011(2):51.
- [17] 关淑艳,赵丽娜,王丕武,等.玉米根部特异性启动子的克隆及功能分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(5):147-153.
- [18] 张琪.转基因玉米植酸酶基因($phyA2$)根系表达功能研究[D].北京:中国农业科学院,2009.
- [19] 孙艳,戴绍军,魏建华,等.转基因植物标记基因安全性研究进展[J].现代农业科技,2012(3):17-20.
- [20] 辛翠花,刘庆昌,屈冬玉,等.无选择标记的植物表达载体的构建[J].园艺学报,2008,35(5):701-706.
- [21] RICHARDSON A E, HADOBAS P A, HAYES J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate[J]. Plant J, 2001, 25(6):641-649.
- [22] LI Guilan, YANG Shaohui, LI Minggang, et al. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(8):1297-1303.
- [23] 闫瑞叶,李喜焕,李桂兰,等.植酸酶基因 $phyA$ 转化大豆品种研究[J].大豆科学,2011,30(3):356-361.

【责任编辑 霍 欢】