

菌根化马尾松磷转运蛋白家族基因 的生物信息学和表达分析^①

张 婷^{1,2}, 丁贵杰², 文晓鹏^{1,2}

1. 贵州大学 农业生物工程研究院/生命科学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 贵州大学 林学院, 贵阳 550025

摘要: 利用同源克隆法从菌根化马尾松中获得 14 条磷转运蛋白基因片段, 对其中 6 条(*PmP1*~*PmP6*)编码的氨基酸序列进行了比对和同源性分析, 检测了不同磷水平下各成员的表达模式. 结果表明, *PmP1*~*PmP6* 编码氨基酸序列具有 Pht1 磷转运蛋白家族的典型特征, 成员间相似性达 70% 以上. 系统分析表明, 它们分为 5 个亚组, 与双子叶植物的同源性较高, 且高度进化保守. 综合分析半定量和荧光定量 PCR 结果显示, *PmP1*~*PmP6* 的表达受外生菌根诱导, 且根、茎和针叶中均有表达. 未接种菌根真菌时, *PmP1*~*PmP6* 在针叶中表达量最高, 其次为根; 接种后, 根中表达活性升高, 其表达量与生长环境中磷水平相关, 低磷条件下被高效激活, 高磷条件反而抑制其表达. 因此, *PmP1*~*PmP6* 参与菌根化马尾松体内磷的吸收和转运过程.

关 键 词: 马尾松; 外生菌根; 磷转运蛋白基因; 表达分析

中图分类号: Q786; S722.3⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0090-09

磷(P)是植物生长发育必需的营养元素之一, 也是植物有机物的重要组成成分, 广泛参与体内能量转移、信号转导、氧化还原等生理生化代谢过程. 由于自然界土壤中能被植物直接吸收的无机磷酸盐(Pi)含量非常低, 往往小于 10 $\mu\text{mol/L}$ ^[1], 出现了土壤缺磷制约植物生长的现象, 因此植物体演化出多种适应磷饥饿的机制, 其中最重要的一种方式是通过菌根进行改善. 世界上超过 90% 的陆生植物能够与土壤菌根真菌形成共生关系^[2], 由植物根表皮和菌根所富集的磷素通过相同或不同家族的多个磷转运蛋白基因进行吸收利用^[3], 其中起重要作用的是 Pht1 磷转运蛋白家族, 它负责植物体磷的吸收和体内转运, 属于 MFS 蛋白家族^[4], 可以利用渗透势梯度来运输溶质分子, 且发现大部分 Pht1 磷转运蛋白基因的表达受低磷胁迫诱导^[5-6]. 据国内外研究表明, 已相继从模式植物和大量的农作物中克隆和鉴定了 Pht1 磷转运蛋白家族基因, 如: 拟南芥已分离到 9 个^[7]、水稻有 13 个^[8], 番茄至少有 5 个^[9] Pht1 家族成员, 由于木本植物基因组庞大和连锁图谱的不完整, 使得对磷转运蛋白基因家族的克隆和功能研究等面临了一些困难.

马尾松(*Pinus massoniana*)是中国湿润亚热带地区分布最广、资源最多的针叶林类型, 主要分布于南方省区, 具有速生、丰产、适生性强、用途广等优良特性, 是典型的外生菌根(Ectomycorrhizal fungi, ECM)树种^[10]. 自然界生长的马尾松根末端不形成根毛结构, 而与大量外生菌根真菌形成共生体系, 其对水分、营养物质的吸收, 绝大部分也是通过菌根结构来实现, 因此外生菌根在马尾松耐低磷机制中起着重

① 收稿日期: 2016-03-24

基金项目: 贵州省科技重大专项(20126011-1); 国家 863 子项目(2011AA10020301).

作者简介: 张 婷(1984-), 女, 山东恒台人, 博士研究生, 主要从事林木生理生化与分子生物学研究.

通信作者: 文晓鹏, 博士, 教授.

要作用. 迄今为止, 马尾松磷转运蛋白基因的克隆及表达分析尚属空白, 特别是外生菌根对磷转运蛋白基因表达的影响未见报道. 本研究利用耐低磷的优良马尾松家系, 克隆、筛选出马尾松 Pht1 家族磷转运蛋白家族基因, 并分析在不同磷水平、不同组织中菌根对其表达的影响, 旨在为马尾松磷高效分子育种提供优良的候选基因, 对解析马尾松耐低磷机制具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

材料选自四川眉山市丹棱县杨场镇生长势优良的 20 年龄的马尾松种子, 前期研究表明, 该家系耐低磷能力强(待发表). 在贵州大学温室中培育 1 年龄实生苗. 供试土壤采自贵州贵阳市孟关林场, 采集距土表层 50 cm 下的土壤作为育苗基质, pH 值为 5.08, 有机质 5.71 g/kg, 全氮 0.43 g/kg, 碱解氮 38.38 mg/kg, 全磷 0.12 g/kg, 有效磷 1.32 mg/kg, 全钾 4.23 g/kg, 速效钾 28 mg/kg, 属低磷黄壤粘土, 按体积 9:1 与河沙混合. 基质、珍珠岩、育苗盘和培养钵等进行灭菌处理后待用.

试验菌种包括美味牛肝菌(*Boletus edulis*, 北京农学院曹庆芹教授惠赠)和彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*, 贵州大学植物生理实验室), 两种菌种按 1:1 混合施用. 将基质进行拌菌处理, 在距离土层表面 2/3 处理入固体菌剂, 距土表 1/3 处喷洒液体菌剂, 再采用液体与固体菌剂混合接种 1 年生马尾松根系, 移栽入土后覆上灭菌的珍珠岩.

试验设不接种对照组和外生真菌混合接种试验组. 磷浓度条件分别为 0, 5, 50, 500, 5 000 $\mu\text{mol/L}$, 每组处理 10 株, 重复 4 次, 用 1/2 Hoagland 营养液浇灌. 分别在第 0, 6, 12, 18, 24, 30 d 采集不经磷处理的接种试验组 and 对照组根系, 在第 90 d 收获不同磷水平处理后的根、茎、针叶组织.

1.2 RNA 提取及反转录

用 RNA 试剂盒(Tiagen 公司)配合 RNA Reagent(Invitrogen 公司)分别提取不同处理的马尾松根、茎、针叶的总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳以及紫外分光光度计检测其浓度和纯度, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存. 利用 M-MLV 反转录酶(Promega 公司)合成 cDNA 第一链, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.3 磷转运蛋白基因的克隆

根据 NCBI 公布的植物 Pht1 磷转运蛋白家族的基因序列(包括菌根诱导型和菌根特异型), 利用 PrimerPlus5 以及 CODEHOP 法大量设计简并引物进行克隆. PCR 反应扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $54\sim 61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 7 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止反应. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收、纯化, 连接 T 载体(Promega 公司), 重组子转化到 DH5 α (Tiagen 公司), 在培养基(Ampicilin/X-gal/IPTG)上筛选; 挑取单个白色菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 抽提质粒, 送生工生物工程(上海)公司测序.

1.4 生物信息学分析

利用 BLAST 程序推定、比对获得基因片段的氨基酸序列以及对 Pht1 编码蛋白功能域进行预测; 通过 Clustal W 软件和 GeneDoc 2.7.0 将获得的基因与裸子、双子叶及单子叶代表植物的 Pht1 氨基酸序列进行多重比对分析; 利用 MEGA 5.0 软件, 选择 NJ(Neighbor-Joining)法进行 1 000 次抽样, 制作系统进化树.

1.5 基因表达分析

以不同处理的马尾松根、茎、叶 cDNA 为模板, 选用稳定表达的 *UBQ* 和 *18S* 基因作为内参, 据获得的马尾松 Pht1 磷转运蛋白基因设计特异引物(表 1), 对菌根化根系中不同时间的表达特征和不同磷水平的处理进行定量 PCR 检测, 分析磷转运蛋白基因相对表达情况. 半定量 PCR 分别调整 cDNA 模板浓度使内参基因表达量一致, PCR 扩增后产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测. 利用 Gene Tools 图像软件分析电泳条带的灰度值, 每条差异基因的灰度值与相同处理内参基因条带灰度值之比代表基因的相对表达量. 荧光定量 PCR 采用 Power SYBR Green Master Mix 试剂盒(ABI 公司), 反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行. 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min 后, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s; $56\sim 58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s 共 40 次循环, 绘制

溶解曲线, 重复 3 次, 操作按程序说明进行. 采用 $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ 法获得各基因相对内参基因的表达量, 利用 SPSS 13.0 进行方差分析, Excel 2007 作图.

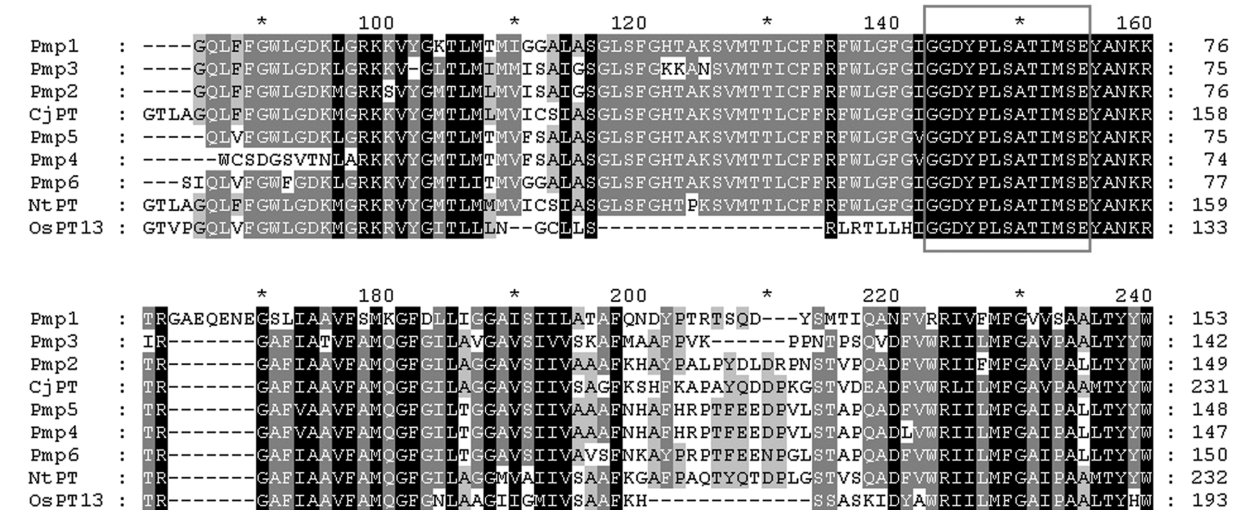
表 1 基因表达分析所用引物序列

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物大小/bp	退火温度/℃
<i>PmP1</i>	TTGTCCACACGAAGTCC	CACACGGCCAAATCAGT	283	57
<i>PmP2</i>	GCGTTGCTCACTTATTA	GTGCTCGTTGTCCCCAG	239	56
<i>PmP3</i>	ATCGTGGCTGTGTCGTT	ATTTCCGGTGGCCTTAA	282	56
<i>PmP4</i>	CCATGTGCTCGTCGTCC	CGGCGTTGCTCACTTATT	239	58
<i>PmP5</i>	CGGCGTTGCTCACTTATT	CGTGGTCCTTTGATTTGC	155	56
<i>PmP6</i>	CCTGCCTATGCGGTCTATG	GCCACGGGCTTCATCTT	239	58
<i>UBQ</i>	GATTTATTTTCATTGGCAGGC	AGGATCATCAGGATTTGGGT	270	55~60
<i>18S</i>	TTAGGCCATGGAGGTTTGAG	GAGTTGATGACACGCGCTTA	209	55~60

2 结果与分析

2.1 马尾松磷转运蛋白基因片段的克隆

将获得的 14 条序列上传到 NCBI 数据库进行比对分析, 结果表明, 克隆的基因片段与日本柳杉 (BAE92291)、烟草 (AAF74025) 等植物的磷转运蛋白基因具有较高的相似性. 将基因的氨基酸序列与 *CjPT* (日本柳杉)、*NtPT* (烟草)、*OsPT13* (水稻) 等植物的磷转运蛋白基因序列进行比对, 发现其中有 6 个成员都具有 Pht1 家族磷转运蛋白基因的特征序列 GGDYPLSATIMSE (图 1). 将这 6 个基因片段分别命名为 *PmP1* (826 bp)、*PmP2* (825 bp)、*PmP3* (829 bp)、*PmP4* (1 283 bp)、*PmP5* (1 284 bp)、*PmP6* (1 282 bp), 成员间相似性达 70% 以上. 此外, 对编码蛋白功能域进行分析发现 6 个基因中均含有 2A0109 结构域, 它是 $H_2PO_4^-/H^+$ 转运子, 属于 MFS 转运蛋白家族.



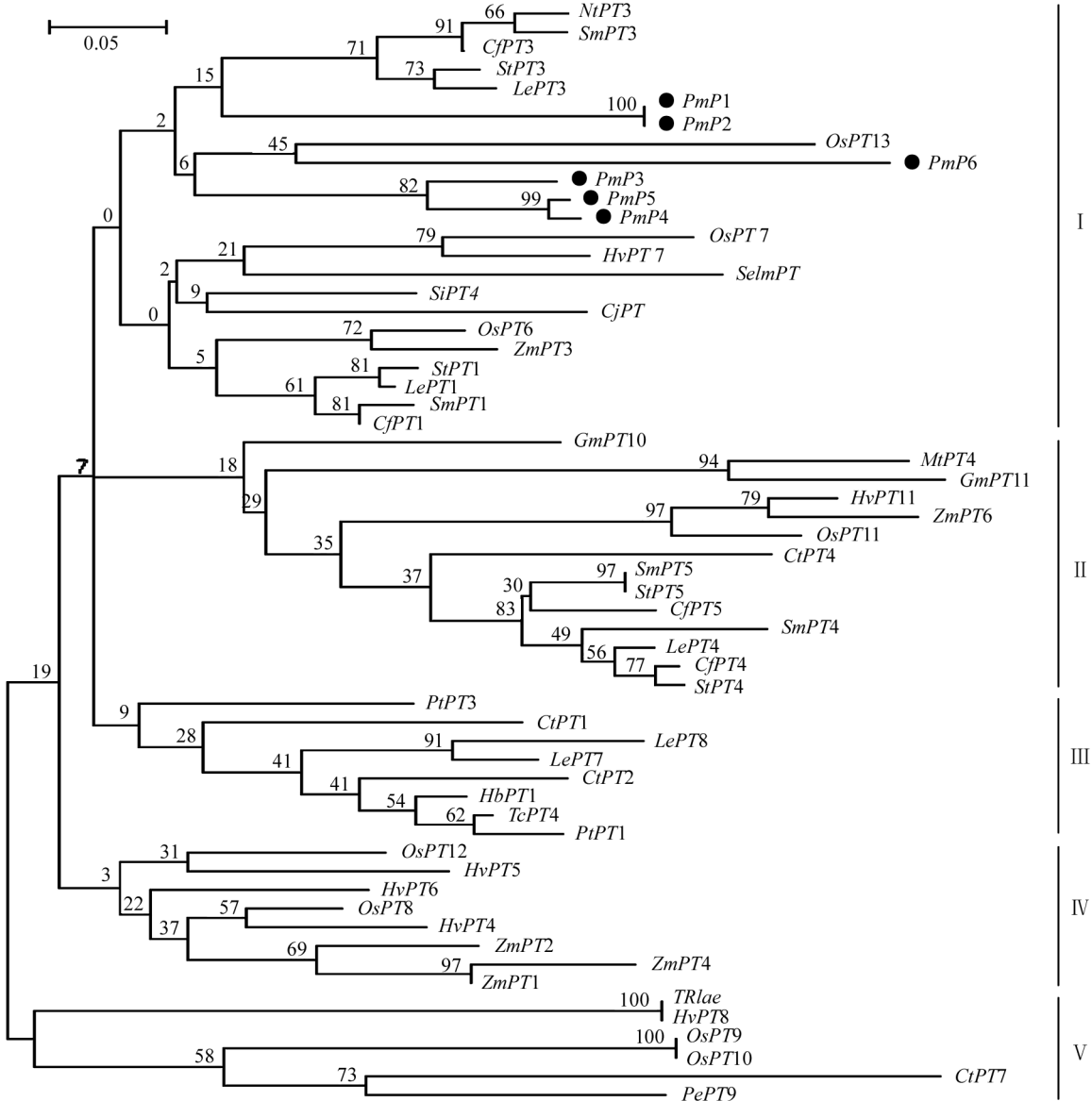
方框内序列为 Pht1 基因家族特征序列 GGDYPLSATIMSE
CjPT, (Cryptomeria japonica, BAE92291); *NtPT*, (Nicotiana tabacum, EF091669);
OsPT13, (Oryza sativa, AF536973).

图 1 马尾松磷转运蛋白氨基酸部分序列比对

2.2 系统进化分析

为探明马尾松与其他植物磷转运蛋白的进化关系, 通过邻接法构建马尾松与 53 个 Pht1 磷转运蛋白基因的系统发育树 (图 2). 根据较近的共线性关系, 各成员被划分为 5 个不同的亚组, 马尾松 6 个 Pht1 磷转运蛋白基因的遗传距离较近聚为一个亚组, 其中 *PmP1* 和 *PmP2* 彼此具有最高同源性, *PmP3*、

PmP4 和 *PmP5* 同源性较高, 其亲缘关系较近的有番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中 *LePT3*, 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中 *StPT3*, 辣椒 (*Capsicum frutescens*) 中 *CfPT3*, 茄子 (*Solanum melongena*) 中 *SmPT3* 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中 *NtPT3*, 且均属于双子叶草本植物. 而 *PmP6* 单独和单子叶植物水稻 (*Oryza sativa*) 中 *OsPT13* 聚为一类. 获得的大部分马尾松 *Phl1* 家族磷转运蛋白与双子叶植物的亲缘关系要更近一些.



CjPT, *Cryptomeria japonica*; *SelmPT*, *Selaginella moellendorffii* hypothetical protein; *LePT1*, *LePT3*, *LePT4*, *LePT7*, *LePT8*, *Lycopersicon esculentum*; *StPT1*, *StPT3*, *StPT4*, *StPT5*, *Solanum tuberosum*; *MtPT4*, *Medicago truncatula*; *SmPT1*, *SmPT3*, *SmPT4*, *SmPT5*, *NtPT3*, *Solanum melongena*; *NtPT3*, *Nicotiana tabacum*; *CtPT1*, *CtPT2*, *CtPT4*, *CtPT7*, *Citrus trifoliata*; *TRI-ae*, *Triticum aestivum*; *GmPT10*, *GmPT11*, *Glycine max*; *TcPT4*, *Theobroma cacao*; *CfPT1*, *CfPT3*, *CfPT4*, *CfPT5*, *Capsicum frutescens*; *PtPT1*, *PtPT3*, *Populus trichocarpa*; *PePT9*, *Populus euphratica*; *HbPT1*, *Hevea brasiliensis*; *ZmPT1*, *ZmPT2*, *ZmPT3*, *ZmPT4*, *ZmPT6*, *Zea mays*; *OsPT6*, *OsPT7*, *OsPT8*, *OsPT9*, *OsPT10*, *OsPT11*, *OsPT12*, *OsPT13*, *Oryza sativa*; *SiPT4*, *Sesamum indicum*; *HvPT4*, *HvPT5*, *HvPT6*, *HvPT7*, *HvPT8*, *HvPT11*, *Hordeum vulgare*.

图 2 马尾松菌根 *Phl1* 磷转运蛋白的进化树分析

2.3 菌根化根系中 *PmP1*~*PmP6* 在不同时间的表达特征

测定马尾松根部在不同处理时间(菌根接种 0,6,12,18,24,30 d)的荧光定量相对表达量. 图 3 表明, 不同时间点 *PmP1*~*PmP6* 在马尾松根部的表达量不同, 随时间延续所有基因的表达量都呈上升趋势. 根中

PmP1~*PmP6* 的表达均受外生菌根的诱导, 其表达量都显著高于不接种对照, 其中 *PmP1* 在第 30 d 的表达量比无侵染对照显著性提高了 5 倍左右, 而 *PmP2*~*PmP6* 表达量呈曲线式上升, 比不接种对照增强了约 2~3 倍。

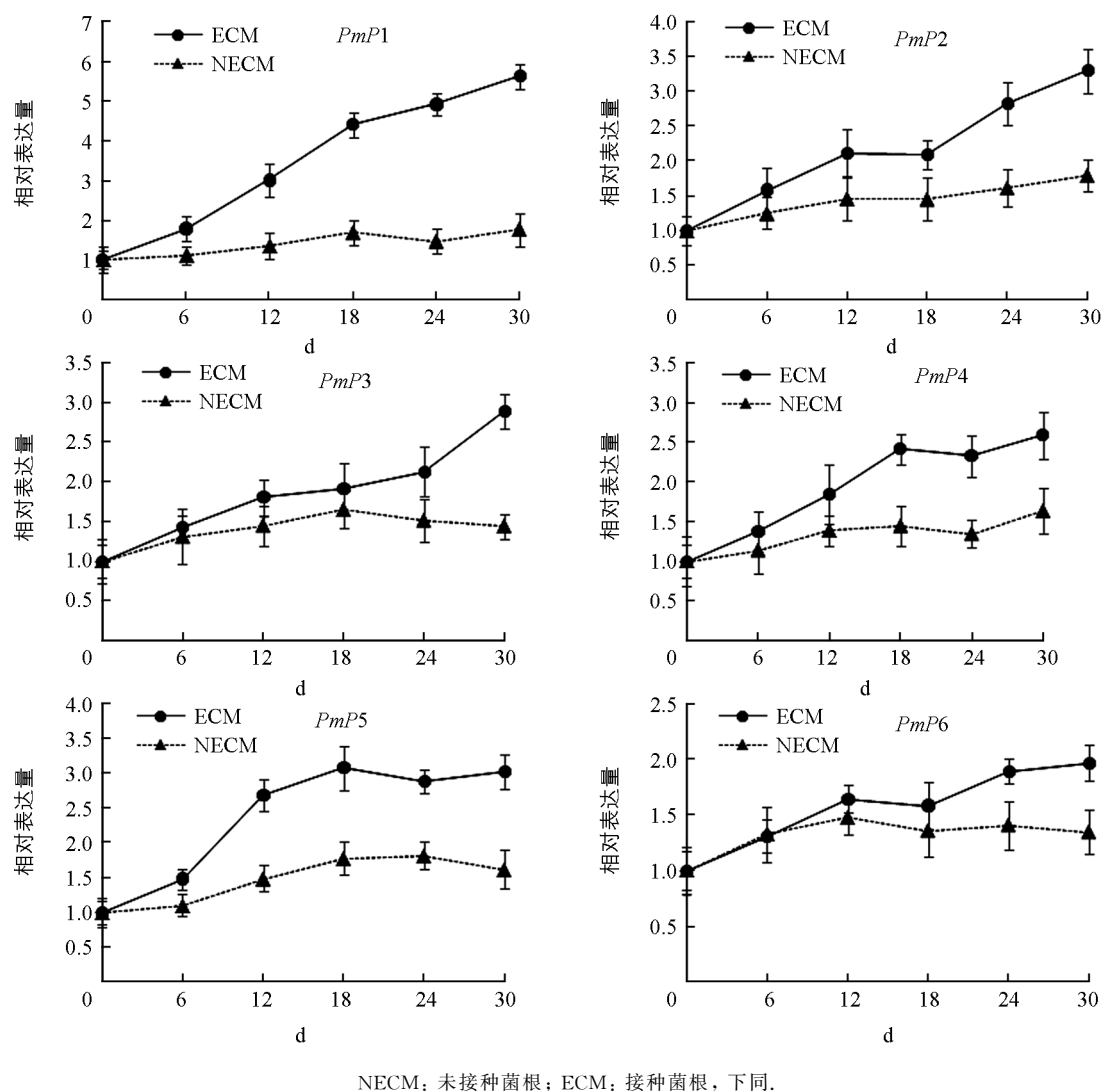


图 3 根系中 *PmP1*~*PmP6* 在不同时间的表达特征

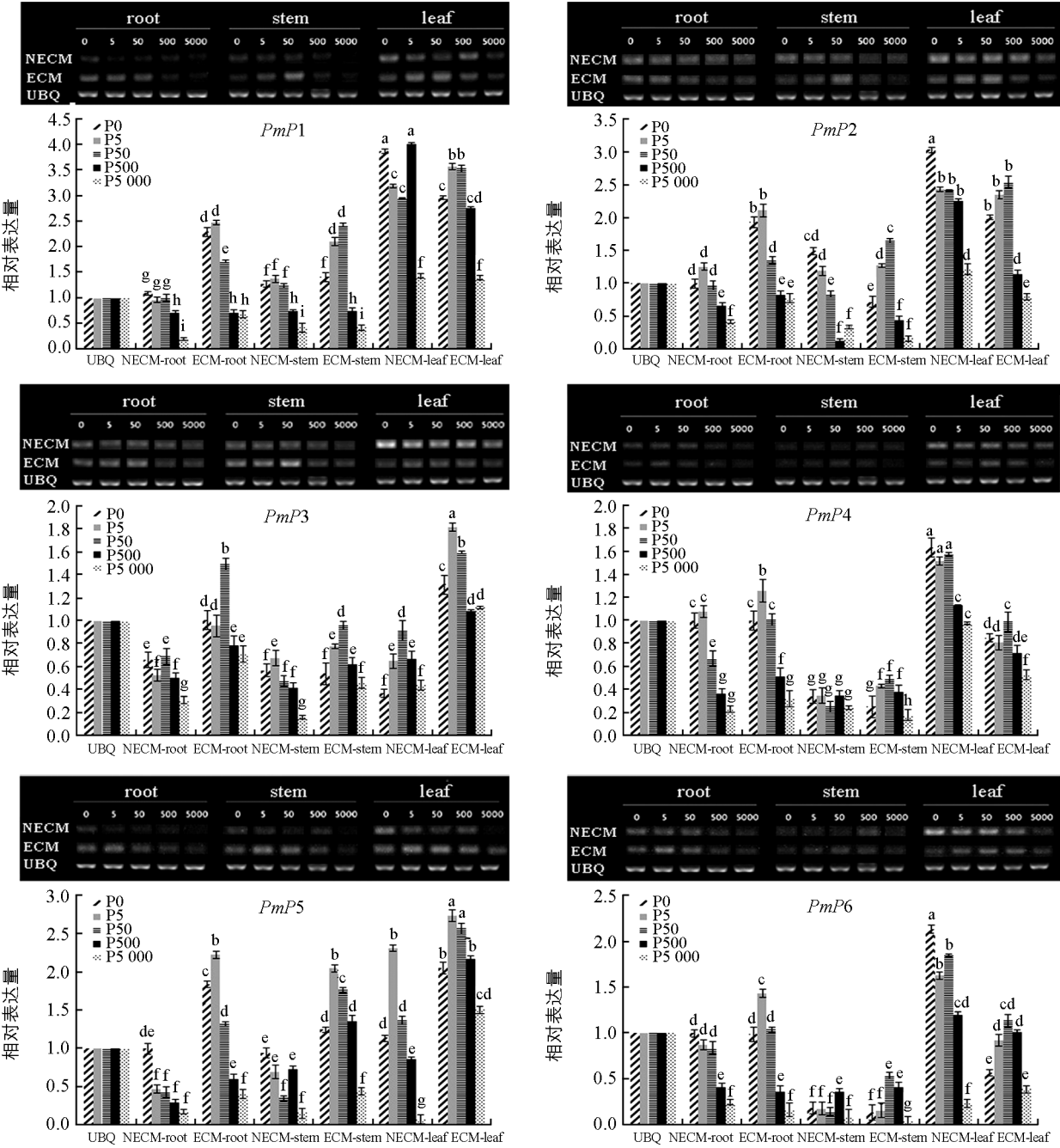
2.4 半定量表达分析

利用半定量 PCR 检测马尾松 *Ph1* 家族基因在不同组织、不同磷水平下的相对表达情况。结果显示 (图 4), 6 个基因在根、茎、针叶中都有表达, 但不同处理下相同部位表达量不同; 相同处理后不同组织其表达量也不同。 *PmP1*~*PmP6* 在未接种菌剂的马尾松针叶中大量表达, 其次为根, 茎中最少; 接种菌根菌后, 根和茎中的表达量比未接种处理的均有不同程度的上调, 针叶中 *PmP4* 和 *PmP6* 表达量呈显著下调趋势。磷浓度变化影响了马尾松 *Ph1* 磷转运蛋白基因表达, 包括根、茎、针叶中的 *PmP1*~*PmP6* 在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 低磷浓度范围内表达量显著高于 500~5 000 $\mu\text{mol/L}$ 高磷浓度范围的表达, 特别是接种菌根真菌比不接种的根系对低磷水平的响应更为明显。在极度缺磷 (0 $\mu\text{mol/L}$) 的条件下, 未接种菌根菌的针叶中 *PmP1*、*PmP2*、*PmP4*、*PmP6* 表达量均显著性高于接种处理。

2.5 荧光定量表达分析

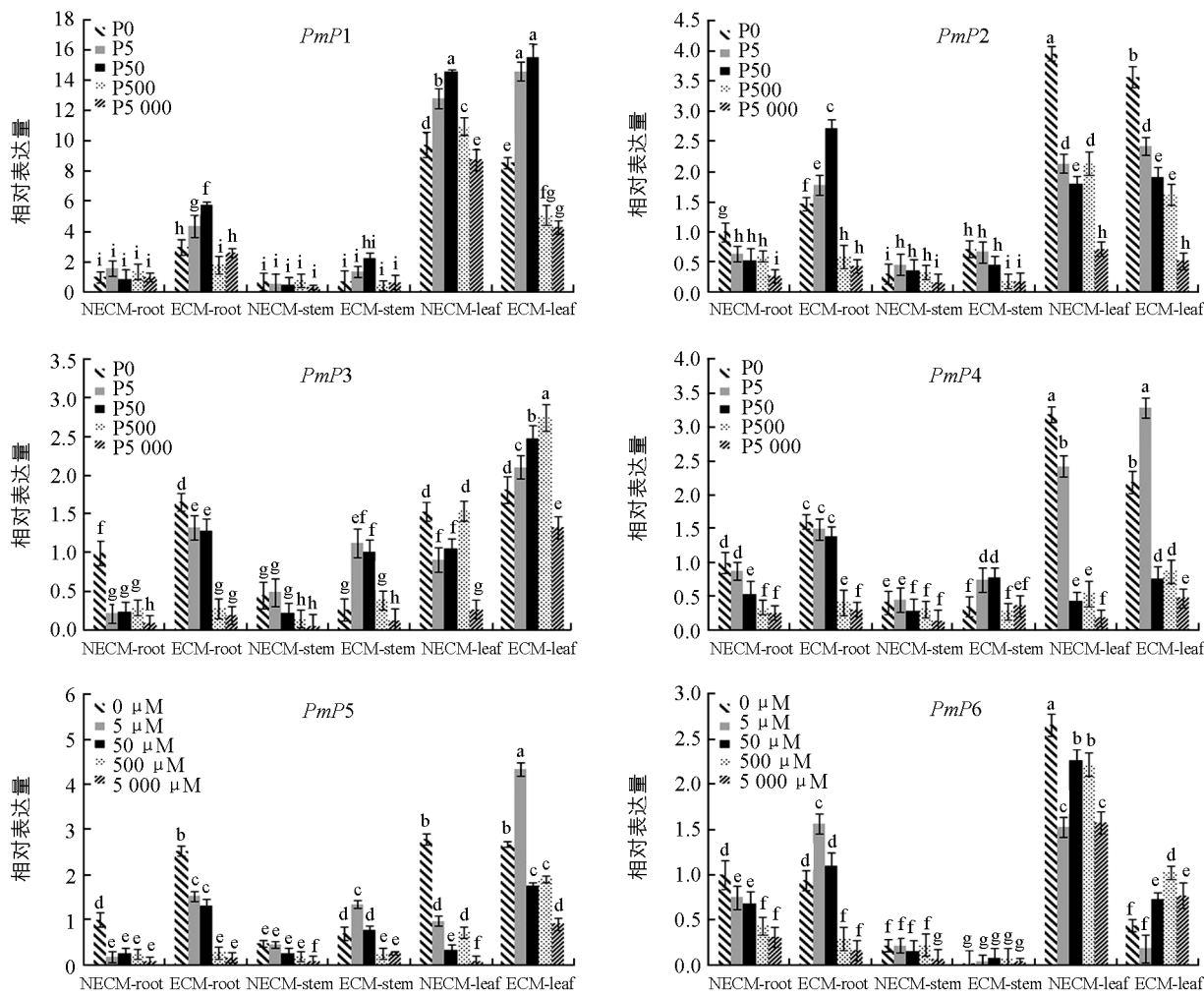
实时荧光定量 PCR 检测马尾松磷转运蛋白基因相对表达量 (图 5) 的结果表明, 未接种菌根菌的针叶中 *PmP1* 表达量显著高于根和茎, 接种后在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 低磷浓度范围内根系的相对表达量是

未处理的 3~6 倍, 茎、叶中变化幅度不大, *PmP2* 表达模式与 *PmP1* 相似. 在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度范围内, 接种菌剂植株中 *PmP3* 表达量高于未接种处理, *PmP4* 和 *PmP5* 在根、茎中表达模式与此类似, 其在 5 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度处理的菌根化针叶中表达量提升最显著. 与未接种对比, *PmP6* 在接种处理后针叶的表达量有明显下降, 特别是在 0~5 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度范围内, 其相对表达量比未接种的下降了 5~7 倍. 极度缺磷(0 $\mu\text{mol/L}$)状况下, *PmP2*、*PmP4*、*PmP6* 在未接种的针叶中表达量显著性最高, 接种后下调表达. 综上所述, 荧光定量表达分析的结果与半定量表达分析比较一致, 外生菌根能诱导 *PmP1*~*PmP6* 在马尾松根、茎、针叶中表达量的变化, 在磷浓度 0~5 $\mu\text{mol/L}$ 间, 大部分 *Pht1* 磷转运蛋白基因表达量明显增强, 而磷浓度在 500~5 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内下调表达.



不同字母表示差异显著性($p < 0.05$).

图 4 不同磷水平对磷转运蛋白基因半定量表达的影响



不同字母表示差异显著性 ($p < 0.05$).

图 5 不同磷水平对磷转运蛋白基因荧光定量表达的影响

3 讨论

磷转运蛋白基因是植物与菌根真菌共生过程中所特异驱动基因, 它编码植物菌根吸收途径中磷素利用的关键蛋白^[11-12], 其中 Pht1 家族是当今菌根互作研究中最重要磷转运蛋白^[9, 13]. 本研究利用简并引物分离克隆了菌根化马尾松 Pht1 磷转运蛋白家族基因, 筛选出 Pht1 家族的 6 个基因片段, 其氨基酸序列之间有较高同源性, 均具有 GGDYPLSATIMSE 的保守序列. Karandashov 等^[11]研究表明, 所有 Pht1 磷转运蛋白基因都具有 GGDYPLSxxIxSE 的特征序列, 证明了 *PmP1*~*PmP6* 属于 Pht1 家族成员. 分子系统分析表明, *PmP1*~*PmP6* 基因属于一个亚组, 它们与 *StPT3*(马铃薯)、*LePT3*(番茄)、*CfPT3*(辣椒)、*SmPT3*(茄子)及 *NtPT3*(烟草)等茄科双子叶植物亲缘关系最近, 其中马铃薯 *StPT3* 是第一个被克隆了的在植物与真菌间起作用的 Pht1 磷转运蛋白基因, 主要在包含丛枝孢囊的根皮层细胞中表达, 该基因被证实属于高亲和力转运蛋白^[14]; 后来, *LePT3*、*CfPT3*、*SmPT3* 和 *NtPT3* 基因也都被证实可以被菌根诱导表达^[9]. 而 *PmP6* 单独与 *OsPT13*(水稻)聚为一类, 后者也被证实属于菌根诱导型. 因此, 从接种菌根菌的马尾松根系中获得的 *PmP1*~*PmP6* 极有可能是能被菌根诱导的磷转运蛋白基因.

根据植物的进化演变, 裸子植物比被子植物要古老, 对磷素的吸收和转运起作用的马尾松 Pht1 家族磷转运蛋白却和被子植物中双子叶类的亲缘关系很相近. 即使是进化树上相距很远的基因 *OsPT13* 和 *TR1ae*, 其氨基酸序列相似性也达到 55.65%, 这反映出植物菌根磷酸盐转运蛋白在进化上具有较高的保守性. 说明马尾松 Pht1 家族的磷转运蛋白基因在漫长的进化过程中极其保守. 有分析还发现 *StPT3* 启动

子区有一个类转座子序列元件,表明 *StPT3* 是由普通 *Pht1* 转运蛋白在启动区突变得到的^[14],而在进化树中与其相邻的另一个亚组中的 *StPT5*、*LePT4*、*OsPT11* 和 *MtPT4* 等则是从同一古老基因进化而来^[9]^[15-16],对马尾松 *Pht1* 磷转运蛋白演化的研究有新的启示。

基因表达分析证明,无论是否受外生真菌侵染, *PmP1*~*PmP6* 在根、茎、叶中都有表达,接种后 *PmP1*~*PmP6* 在根部表达量有不同程度上调,这与 Nagy 等人的结果一致^[9],但茎和针叶中的表达量也有变化,与其他研究结果不同。有报道认为,绝大部分克隆了的 *Pht1* 家族磷转运蛋白基因主要是在根部起作用,负责磷的吸收和转运^[3],如:拟南芥有 8 个基因^[7],水稻中有 10 个基因都在根部表达^[8]。其在茎和针叶中的表达和变化可能与磷在植物体内的分布有关,各基因在苗期与成熟期中组织间表达量的不同,可能是由生长过程中磷吸收量所致^[17]。缺磷环境中,与未接种菌根菌处理相比,接种根系中 *PmP1*~*PmP6* 上调表达,而针叶中表达量下降,这种低磷胁迫下转录水平的变化可能由根系共生的菌根和土壤中可溶性无机磷的浓度综合调控。菌根真菌激活了低磷环境中马尾松根部磷转运蛋白基因的显著表达,茎和针叶中其表达量也发生改变,可能是 *Pht1* 家族基因的组织特异性和时空特异性的表达,提示 *PmP1*~*PmP6* 在马尾松吸收、转运磷的过程中可能具有不同作用。马尾松 *Pht1* 家族成员 *PmP1*~*PmP6* 在 0~5 $\mu\text{mol/L}$ 低磷浓度范围内有不同程度的上调表达趋势,而在 500~5 000 $\mu\text{mol/L}$ 高磷浓度范围中下调表达,与 Nagy 研究结果一致,菌根磷转运蛋白基因的表达与磷水平相关,与磷饥饿途径无关^[12]。

本研究克隆、筛选了 6 个马尾松 *Pht1* 家族磷转运蛋白基因, *PmP1*~*PmP6* 受外生菌根的诱导,其不同磷浓度处理下根、茎、针叶中表达量不同,具体表现为低磷水平下被高效激活,高磷水平下表达反被抑制。这为进一步研究菌根诱导型 *Pht1* 磷转运蛋白家族基因全长和功能奠定了基础,也为全面解析马尾松耐低磷机制提供了新信息。

参考文献:

- [1] BIELESKI R L. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1973, 24(1): 225-252.
- [2] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal Symbiosis [M]. Academic Press, 2010.
- [3] SMITH F W, RAE A L, HAWKESFORD M J. Molecular Mechanisms of Phosphate and Sulphate Transport in Plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2000, 1465(1/2): 236-245.
- [4] PAO S S, PAULSEN I T, SAIER M H. Major Facilitator Superfamily [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(1): 1-34.
- [5] BUCHER M, RAUSCH C, DARAM P. Molecular and Biochemical Mechanisms of Phosphorus Uptake Into Plants [J]. Plant Nutr Soil Sci, 2001, 164(2): 209-217.
- [6] JAVOT H, PUMPLIN N, AND HARRISON M J. Phosphate in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Transport Properties and Regulatory Roles [J]. Plant Cell Environ, 2007, 30(3): 310-322.
- [7] MUDGE S R, RAE A L, DIATLOFF E, et al. Expression Analysis Suggests Novel Roles for Members of the *Pht1* Family of Phosphate Transporters in Arabidopsis [J]. The Plant Journal, 2002, 31(3): 341-353.
- [8] PASZKOWSKI U, KROKEN S, ROUX C, et al. Rice Phosphate Transporters Include an Evolutionarily Divergent Gene Specifically Activated in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(20): 13324-13329.
- [9] NAGY R, KARANDASHOV V, CHAGUE V, et al. The Characterization of Novel Mycorrhiza-Specific Phosphate Transporters from *Lycopersicon Esculentum* and *Solanum Tuberosum* Uncovers Functional Redundancy in Symbiotic Phosphate Transport in Solanaceous Species [J]. The Plant Journal, 2005, 42(2): 236-250.
- [10] 马 琼,黄建国,蒋剑波. 接种外生菌根真菌对马尾松幼苗生长的影响 [J]. 福建林业科技, 2005, 32(2): 85-88.
- [11] KARANDASHOV V, BUCHER M. Symbiotic Phosphate Transport in Arbuscular Mycorrhizas [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(1): 22-29.
- [12] NAGY R, DRISSNER D, AMRHEIN N, et al. Mycorrhizal Phosphate Uptake Pathway in Tomato is Phosphorus-Repressible and Transcriptionally Regulated [J]. New Phytologist, 2009, 181(4): 950-959.
- [13] HARRISON M J. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis [J]. Annu Rev Microbiol, 2005, 59(2): 19-42.

[14] RAUSCH C, DARAM P, BRUNNER S, et al. A Phosphate Transporter Expressed in Arbuscule-Containing Cells in Potato [J]. *Nature*, 2001, 414(6862): 462—470.

[15] XU G, CHAGUE V, MELAMED-BESSUDO C, et al. Functional Characterization of LePT4: a Phosphate Transporter in Tomato with Mycorrhiza-Enhanced Expression [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(10): 2491—2501.

[16] 杨存义, 刘 灵, 沈 宏, 等. 植物 Pht1 家族磷转运子的分子生物学研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(2): 153—159.

[17] AI P, SUN S, ZHAO J, et al. Two Rice Phosphate Transporters, OsPht1; 2 and OsPht1; 6 Have Different Functions and Kinetic Properties in Uptake and Translocation [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(5): 798—809.

Bioinformatic and Expression Analyses of the Ectomycorrhizal Phosphate Transporter Gene in *Pinus massoniana*

ZHANG Ting^{1,2}, DING Gui-jie², WEN Xiao-peng^{1,2}

1. Institute of Agro-Bioengineering and College of Life Sciences, Guizhou University/ The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guiyang 550025, China;

2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: In this study, 14 fragments of the ectomycorrhizal masson pine (*Pinus massoniana*) phosphate transport protein gene (*PmPs*) were obtained using the homologous cloning method, of which 6 (*PmP1*~*PmP6*) were used to carry out homology analysis based on their amino acid sequences. Subsequently, their expression patterns were characterized by the semi-quantitative and quantitative PCR technology. The results showed that the amino acid sequences of *PmP1*~*PmP6*, which were highly homologous at the amino acid level with over 70% identity, had a typical structure of the members of the Pht1 family. Phylogenetic analysis indicated that they might be distinctly divided into five subgroups and demonstrated that they were highly homologous with dicotyledons, reflecting the considerably strict conservation during the evolutionary process. Semi-quantitative and quantitative PCR suggested that the expression of *PmP1*~*PmP6* might be induced by the ectomycorrhizal fungi (ECM), which were expressed in the leaf, the stem and the root. Their expression level in the leaf was significantly higher than that in the stem or root in ECM-free plants. However, a high expression of *PmP1*~*PmP6* was observed in the ECM-inoculated roots, as compared with the non-inoculated control. Additionally, the expression of *PmP1*~*PmP6* was related to the phosphorus status of the soil, and their expression was intensively activated by low phosphorus; in contrast, a high level of phosphorus inhibited the expression of these genes. In conclusion, *PmP1*~*PmP6* might be involved in phosphorus uptake and transport in ECM-inoculated masson pine, which facilitated the understanding of phosphorus absorption as promoted by ectomycorrhiza.

Key words: masson pine (*Pinus massoniana*); ectomycorrhizal fungi; phosphate transporter gene; expression analysis

