

磷转运蛋白 AsPT6 对紫云英结瘤及固氮酶活性的影响

陈冲 李友国 赵斌 林会

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用组织定位、超表达及 RNAi 等方法对紫云英中的 Pht1 家族磷转运蛋白 AsPT6 进行了研究。时空表达结果显示, AsPT6 基因在根、茎、叶中均有表达, 接种根瘤菌后在根和根瘤中大量表达; 化学组织定位分析表明, AsPT6 在根和根瘤的维管组织及根和根瘤连接处均有表达, 起到向根瘤转运磷的作用; 超表达及 RNAi 结果显示 AsPT6 能显著影响紫云英的结瘤及固氮酶活性。这些研究结果表明, AsPT6 参与根瘤形成和发育过程中磷的转运。

关键词 紫云英; 华癸中慢生根瘤菌; 结瘤; 磷转运蛋白; Pht1 家族

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0050-09

氮和磷是植物生长发育不可或缺的元素, 参与植物体内酶和核酸等的合成^[1-2]。绝大多数豆科植物能和根瘤菌进行共生固氮提供氮源^[3-6], 共生固氮过程消耗大量能量, 需要大量的磷参与^[7]。土壤总磷含量十分充足, 但大部分是难溶性磷, 可吸收磷的缺乏严重限制了豆科植物的生长^[8-9]。

磷同样也影响豆科植物根瘤的固氮活性。在豌豆^[10]、大豆^[11]和蒺藜苜蓿^[12]中发现, 随着磷施加量的增加, 根瘤数目和固氮活性也随之增加。在木麻黄^[13]和白羽扇豆^[14]等植物中, 发现磷缺乏严重抑制植株的生长和体内代谢, 从而使植物的结瘤固氮受到影响。所以培育在磷限制条件下仍能高效固氮的豆科作物品种, 对于作物生长、维持农业生态平衡是非常重要的。

豆科植物可以直接或间接从土壤中吸收磷^[15-16], 磷的吸收和转运通过磷转运蛋白进行^[17]。植物中的磷转运蛋白有 Pht1、Pht2、Pht3 和 Pht4 等 4 个家族, 其中对 Pht1 家族蛋白的研究最为广泛^[18]。Pht1 家族蛋白主要位于细胞膜, 起到转运或吸收磷的作用^[19]。目前对于 Pht1 家族的研究主要集中于磷转运蛋白对植物生长和菌根真菌共生过程的影响^[20-23], 而关于磷转运蛋白对豆科植物结瘤固氮影响的分子机制研究甚少。2012 年, Qin 等^[24]

在大豆中鉴定出了一个高亲和力的磷转运蛋白基因 *GmPT5*, 具有将磷从根向根瘤转运的作用, *GmPT5* 的大量表达显著促进大豆的生长和结瘤固氮。百脉根 *LjPT3* 基因沉默会使根瘤数减少, 根瘤固氮酶活性下降^[25]。本研究通过设计兼并引物从紫云英基因组中分离出 Pht1 家族的磷转运蛋白 AsPT6, 并研究 AsPT6 对紫云英结瘤和固氮的影响, 旨在为阐明磷转运蛋白在结瘤固氮中的功能及培育磷限制条件下仍高效固氮的优良的豆科品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

紫云英(*Astragalus sinicus* L.)、华癸中慢生根瘤菌 7653R(*Mesorhizobium huakuii* 7653R, 简称 7653R)、发根农杆菌 k599; 质粒 pCambia2301(简称 2301)、pCambia1301-35S-int-T7(简称 1301)、DX2181G-mCherry(252C-T)(简称 DX2181G)均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮研究室保存。

1.2 盆栽试验

挑选颗粒饱满的紫云英种子, 使用 75% 的乙醇浸泡 10 min 后用无菌水清洗 5~6 遍, 再用 5%

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670243; 31772401); 华中农业大学科技创新基金项目(2662017PY052; 2662017PY121)

陈冲, 硕士研究生, 研究方向: 菌根真菌分子生物学。E-mail: 13871423775@126.com

通信作者: 林会, 博士, 副教授, 研究方向: 菌根真菌分子生物学。E-mail: linhui@mail.hzau.edu

NaClO浸泡10 min后用无菌水反复清洗5~6遍,置于培养箱中浸泡8 h,待种子吸胀,将其均匀平铺在水琼脂的平板上,于培养箱中倒置催芽2~3 d。当幼苗根长到2 cm时移栽。盆栽用到的沙子于120℃灭菌2 h。试验于22℃光照培养室(光照16 h、黑暗8 h)进行。活化7653R,使用TY+Str液体培养基培养,28℃200 r/min摇床震荡培养2~3 d,以1%的接种量扩大培养24 h,使 $D_{600}=1.0$,收集菌液后用无氮营养液洗涤2次后重悬,按每株苗接种1 mL菌液量接菌。设置-R(不接菌)和+R(接种7653R)处理,接菌组于幼苗第1片真叶挺出时接种7653R,试验期间每隔1 d浇低磷(LP: 5 $\mu\text{mol/L}$)或高磷(HP: 1 mmol/L)无氮营养液。

1.3 紫云英DNA和RNA的提取

使用植物总DNA提取试剂盒(天根试剂,DNA mini kit)提取紫云英总DNA。收取紫云英不同组织和不同生长时期植株,使用Trizol法提取紫云英总RNA,选用Thermo公司的反转录试剂盒进行反转录,合成第一链cDNA,置于-20℃冰箱中保存备用。

1.4 AsPT6的启动子和基因全长克隆

按照Jones等^[26]方法进行反向PCR扩增5'端:分别用EcoRI、XbaI单酶切DNA,酶切产物自连后为反向PCR的模板,进行2次嵌套PCR扩增5'UTR,第一轮体系:10 μL Taq Mix, 0.8 μL 上下游引物(AsPT6IF1: TTCACGATTCAGTTGATGGGATT;/ AsPT6IR1: TTCAGCTCCTTCTTCCTTCTTTG), 1 μL 模板, ddH₂O补足到20 μL 。第二轮体系:10 μL Taq Mix, 0.8 μL 上下游引物(AsPT6IF2: TCAGCAGCAGGGAAACTTG/AsPT6IR2: CAACAGCATATGATGGAGCAT), 第一轮产物稀释20倍后加1 μL 做模板, ddH₂O补足至20 μL 。两轮PCR程序均为:94℃5 min;94℃30 s, 60℃30 s, 72℃3 min, 35个循环;72℃10 min, 降温至16℃保存。

3'RACE扩增3'端参照Scotto-LainoE等^[27]的方法,进行两轮巢式PCR扩增,反转录得到cDNA直接作为第一轮扩增模板,第一轮使用引物3'As-PT6-F1: GGGCACAACTCTTATTGCTTTATGT/ Q₀扩增,第二轮使用引物3'AsPT6-F2: GCTACAACATTTGTTGTACCAGCT/ Q₁扩增,第一轮PCR产物稀释400倍后用作第二轮模板。两轮PCR程序均为94℃5 min;94℃30 s, 60℃

40 s, 72℃2 min, 35个循环;72℃10 min。

根据反向PCR, 3'RACE以及已知AsPT6序列获得完整序列后设计启动子引物(AsPT6-promoter-F: CCCAAGCTTTTCGAAGAAATTCATCACTTAAAC/AsPT6-promoter-R: CGCGGATCCTTCTCTCTCACACAAATGCTT), 反应程序:94℃5 min;94℃30 s, 51℃30 s, 72℃80 s, 35个循环;72℃10 min。设计全长引物(As-PT6-ORF-F: TGCTCTAGAATGGCGAAGGAGCAAATCCAA/AsPT6-ORF-R: CGAGCTCTTATACCTCTGTTTCACATTCCTCTTC), 反应程序:94℃5 min;94℃30 s, 55℃30 s, 72℃90 s, 35个循环;72℃10 min。

各PCR终产物分别连接T载体(pMD19T, TaKaRa)于昆泰锐公司测序。

1.5 荧光定量PCR

设计AsPT6基因特异性引物(AsPT6RT-F: AGGTTTCACGATTCAGTTGATGG; AsPT6RT-R: ACCAACCATAGCACCAAGTTTC)和肌球蛋白 β -actin引物(actin-F: GTTCTTTTCCAGCCTTCTATGA/ actin-R: ATGTTTCCGTA-CAGATCCTTTC), 按照SYBR® Green Realtime PCR Master Mix(ROX)说明书配制反应体系。反应条件:95℃10 min;95℃15 s, 58℃20 s, 72℃20 s, 40个循环。反应后对熔解曲线进行分析, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算AsPT6的相对表达量。

1.6 发根农杆菌介导的紫云英转化

1)AsPT6超表达载体的构建。将扩增得到的AsPT6 ORF片段用XbaI和SacI双酶切后连接到2301载体上, 构建AsPT6超表达载体(AsPT6-OE)。

2)AsPT6干扰载体的构建。将扩增得到的正向干扰片段用SacI和BamHI双酶切后连接到1301载体上, 再将反向片段用SalI和XbaI双酶切后连接到重组载体上, 构建干扰载体(AsPT6-RNAi)。

利用电转法^[28]将各载体分别转入发根农杆菌K599, 通过含卡那霉素和链霉素的双抗LB平板筛选阳性克隆。活化含有目的基因的K599, 用LB+Str+Kan的液体培养基培养, 28℃200 r/min摇床震荡培养24 h, 以1%的接种量扩大培养6~7 h, 使 D_{600} 达到0.8~1.0。紫云英种子培养1周后剪去下胚轴以下部分, 获得外植体, 在培养好的菌液中浸泡

10 min 后取出,吸去多余的菌液,平铺于水琼脂培养基中,于 22 ℃ 培养箱中培养 3 d,将外植体使用无菌水冲洗 1 次,转入含羧苄青霉素的无菌的 MS 平板上,22 ℃ 培养箱中培养 3 周。挑选长势好的阳性苗种植于无菌盆中。

1.7 紫云英启动子化学组织定位

通过荧光显微镜(Olympus BX51)筛选带有红色荧光标记的阳性转化植株,选取结瘤不同时期阳性植株根段,参照 Karandashov 等^[29]的方法进行 GUS 染色。将根段浸没在 GUS 染液中,37 ℃ 黑暗的条件下孵育 3~24 h,通过显微镜观察染色根段制片。

2 结果与分析

2.1 AsPT6 基因的扩增和生物信息学分析

利用反向 PCR 和 3'RACE 获得 AsPT6 基因全长序列,包括 1 204 bp 的上游序列和 1 581 bp ORF 序列。使用 MEGA 将 AsPT6 和紫云英、苜蓿、拟南芥、大豆等豆科植株中磷转运蛋白进行多序列比对及进化分析,发现 AsPT6 和这些磷转运蛋白有较高的相似性(图 1)。其中 AsPT6 和 GmPT5 的相似性最高,为 81%,预测 AsPT6 可能与 GmPT5 有相同的功能,与紫云英的结瘤固氮相关。通过PROSITE(<http://prosite.expasy.org>)分析显

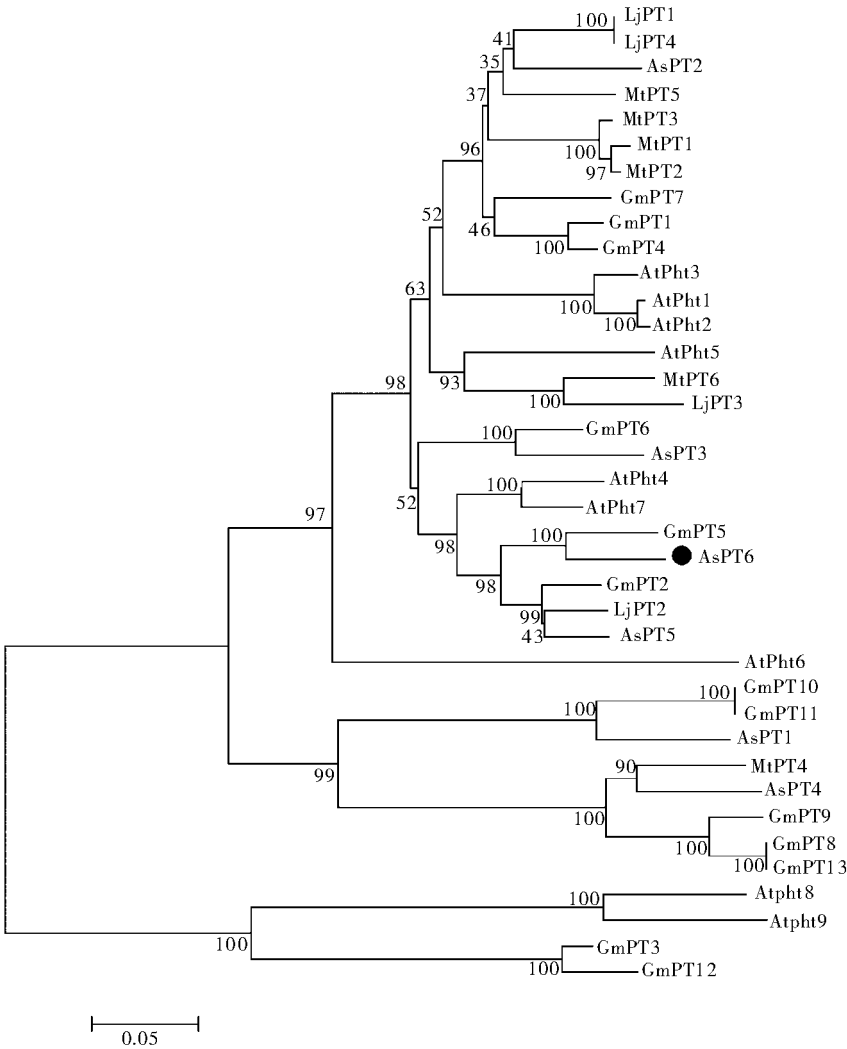


图 1 AsPT6 和豆科植物同源磷转运蛋白的进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of AsPT6 with other phosphate transporters

示,AsPT6 含有 PhT1 特征序列(GGDYPLSATI-XsE)并具有 MFS 超基因家族膜转运蛋白信号标签;SOSUI(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

分析显示,AsPT6 具有高度疏水性,有 11 个跨膜区域。蛋白序列和结构分析结果表明 AsPT6 为 PhT1 家族成员。

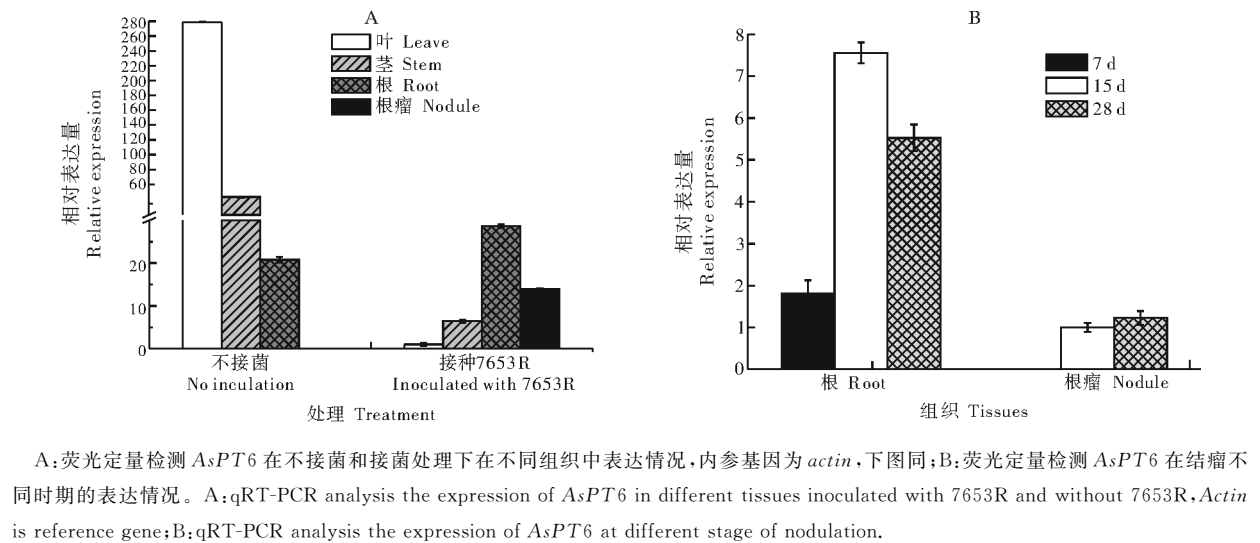
2.2 AsPT6 基因的表达分析

将紫云英接种及不接种根瘤菌培养 28 d 后,检测 AsPT6 在紫云英根、茎、叶中的表达。结果显示,AsPT6 在根、茎、叶中均有表达,在叶中的表达量最高。AsPT6 在叶中的表达量约是茎中表达量的 7 倍,是根中表达量的 15 倍(图 2A)。这一结果表明 AsPT6 在紫云英各组织中均有表达,主要在紫云英地上部分表达。

接种根瘤菌后 AsPT6 在紫云英根、茎、叶和根瘤中均有表达。其在根中的表达量显著增高,且约为不接菌处理植株根的 1.5 倍(图 2A);AsPT6 在茎和叶中的表达量分别下降为未接种植株根中表达量的 25%和 10%;AsPT6 在根瘤中也有表达,其表达量高于在茎叶中的表达量。这一结果显示接种根

瘤菌后,AsPT6 的表达发生明显变化,地上部分的表达显著下降,在根和根瘤中均高量表达,表明 AsPT6 可能参与向根瘤中转运磷的过程。

提取接菌后 7、15 和 28 d 的紫云英根和根瘤部位的 RNA,进行荧光定量分析。定量结果如图 2B,在根中,随着根瘤的形成发育 AsPT6 的表达量呈现先上升后下降的趋势,在第 15 天时表达量最高,表达量约为第 7 天根中的 4 倍,第 28 天时根中 AsPT6 的表达量大约是第 7 天根中的 3 倍;在根瘤中,随着根瘤的成熟,AsPT6 的表达量有所增加,第 28 天的成熟根瘤中 AsPT6 的表达量较高。不同时期根和根瘤中 AsPT6 的表达量的差异进一步表明 AsPT6 的表达与根瘤的形成发育以及固氮有关,AsPT6 可能参与紫云英结瘤固氮过程中的磷转运。



A: 荧光定量检测 AsPT6 在不接菌和接菌处理下在不同组织中表达情况,内参基因为 *actin*,下同;B: 荧光定量检测 AsPT6 在结瘤不同时期的表达情况。A: qRT-PCR analysis the expression of AsPT6 in different tissues inoculated with 7653R and without 7653R, *Actin* is reference gene; B: qRT-PCR analysis the expression of AsPT6 at different stage of nodulation.

图 2 AsPT6 在不同组织中的相对表达量

Fig.2 The expression of AsPT6 in different tissues and at different stage

2.3 AsPT6 的组织表达定位

为了进一步验证 AsPT6 基因与紫云英结瘤固氮的关系,构建了 DX2181G-AsPT6pro: *GUS* 载体,利用 *GUS* 报告基因检测 AsPT6 在紫云英结瘤不同时期的表达定位。结果显示:不接菌时,在根中柱维管组织中检测到 *GUS* 基因的表达(图 3D),表明 AsPT6 具有在植物体内运输磷的功能。接菌后第 7 天,*GUS* 染色结果显示 AsPT6 在根的维管组织中大量表达,在根瘤原基与根的连接处少量表达(图 3E);接菌后第 15 天和第 20 天,在根的维管组织以及根和根瘤连接处发现 *GUS* 的大量表达(图 3F、3G);在接菌后第 28 天,AsPT6 在根及根瘤外层的维管组织大量表达(图 3H),推测 AsPT6 具

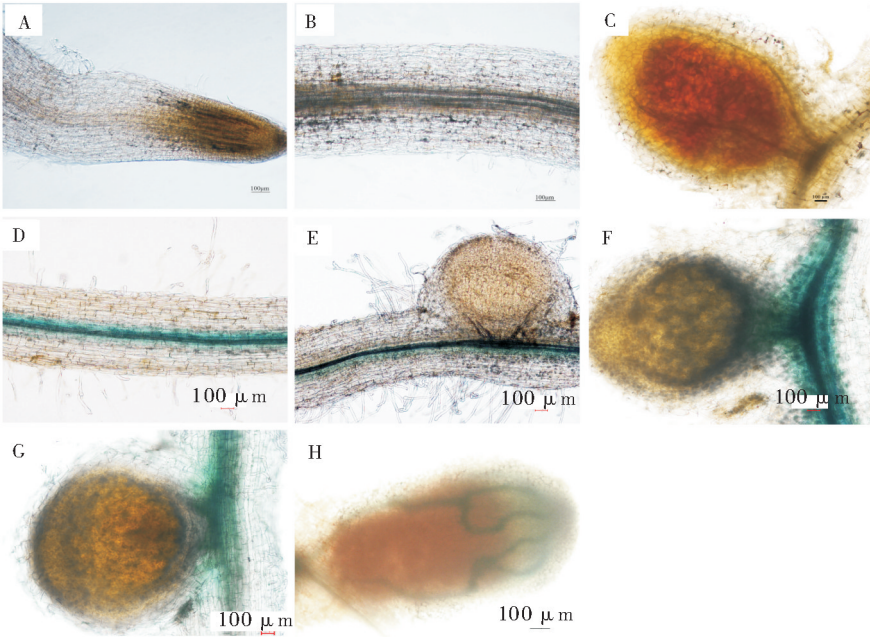
有向根瘤中转运磷的功能。综合结果表明,AsPT6 在根维管束及根瘤中均有表达,且在根瘤成熟进行固氮时表达增强,显示 AsPT6 具有从根向根瘤中转运磷的功能。

2.4 AsPT6 对紫云英结瘤固氮的影响

为了验证 AsPT6 在结瘤和固氮中的功能,构建超表达(OE)和 RNAi 载体,对转化植株的结瘤固氮表型进行检测。超表达试验结果显示:盆栽植株显示超表达植株要比对照植株长势好(图 4);统计分析结果显示:低磷(LP: 5 $\mu\text{mol/L}$)处理条件下,植株鲜质量、根瘤数目和固氮酶活都要低于高磷(HP: 1 mmol/L)处理的植株,超表达植株的鲜质量(图 5B-D)、根瘤数目(图 5E)和根瘤的固氮酶活

(图 5F)要高于空载对照植株,但是两者之间没有显著差异,说明低磷限制了紫云英的生长和结瘤固氮。而在高磷条件下,超表达植株地上部分的鲜质量(图 5B)大约是空载对照植株的 1.3 倍,根瘤鲜质量(图 5D)和根瘤的固氮酶活(图 5F)大约是空载对照

植株的 1.3 倍,根瘤数无显著差异。这一结果进一步表明 *AsPT6* 具有磷转运功能,在高磷条件下,*AsPT6* 的超表达能增强磷向地上部分的转运,进而促进植物生长;在紫云英结瘤过程中,*AsPT6* 能将磷转运到根瘤,进而影响根瘤的发育和固氮。



A-C:空载 DX2181G 对照植株根和根瘤染色;D:DX2181G-*AsPT6*pro:GUS 转化植株根段染色;E-H:在结瘤不同时期 DX2181G-*AsPT6*pro:GUS 转化植株根和根瘤染色;E:接种根瘤菌后 7 d 根中柱及根和根瘤染色,F-G:接种根瘤菌后 15 d 和 20 d 根和根瘤染色,H:接种根瘤菌后 28 d 根和根瘤染色。A to C: GUS stained in root (A and B) and nodule (C) in empty vector control plant; D: GUS stained in root in DX2181G-*AsPT6*pro:GUS plant ; E-H: GUS stained in root and nodule in DX2181G-*AsPT6*pro:GUS plant at different stage of nodulation ,E: GUS stained in root and nodule after seven days with inoculation,F-G: GUS stained in root and nodule after fifteen and twenty days with inoculation,H: GUS stained in root and nodule after twenty-eight days with inoculation.

图 3 结瘤不同时期 *AsPT6* 在根和根瘤中的表达

Fig.3 The expression of *AsPT6* in roots and nodule at different stage of nodulation

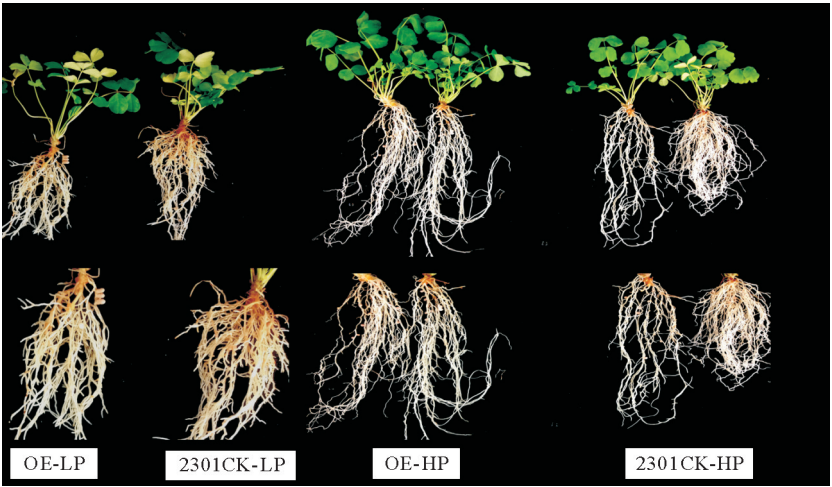


图 4 *AsPT6* 超表达植株结瘤情况

Fig.4 Nodulation of *AsPT6* overexpression plants

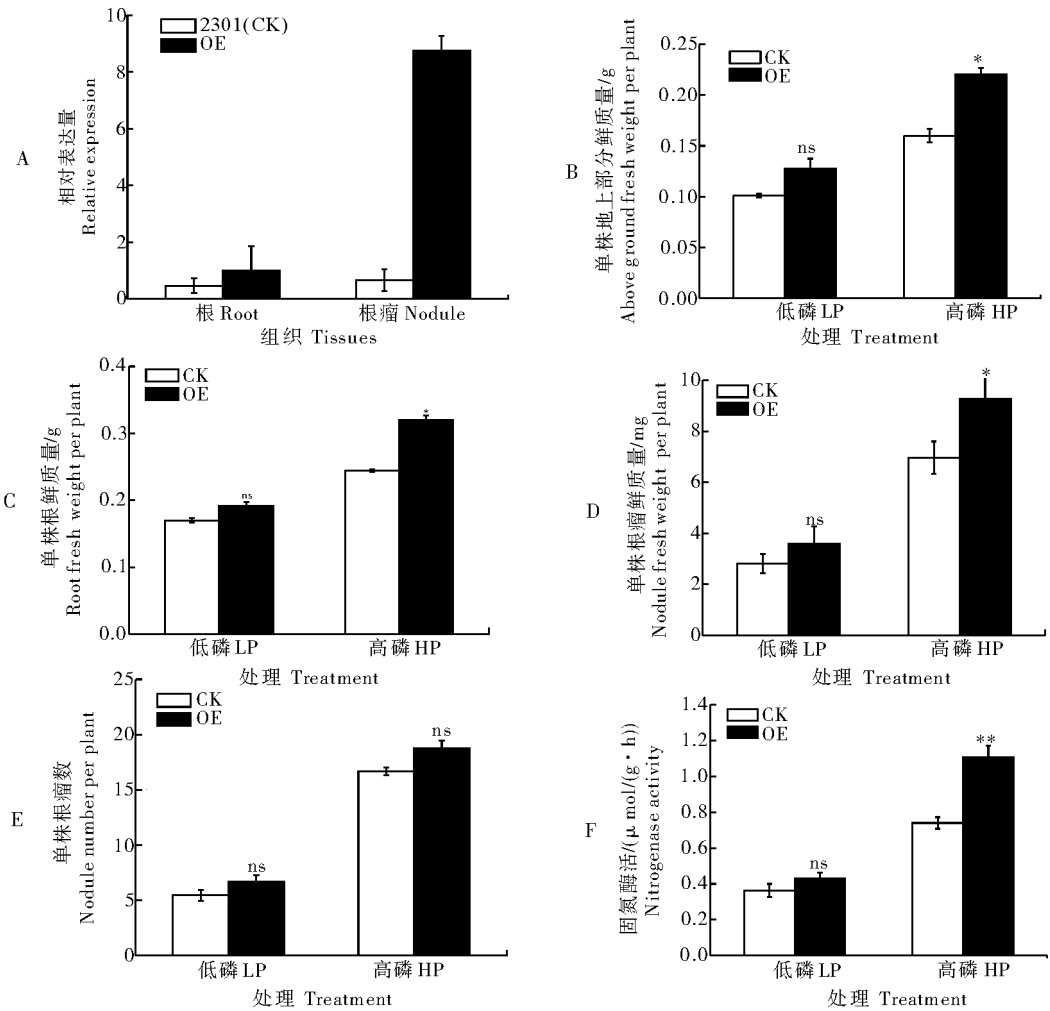


图 5 *AsPT6* 超表达对紫云英结瘤固氮的影响

Fig.5 The effect of *AsPT6* overexpression on nodulation and nitrogen fixation

AsPT6-RNAi 结果显示沉默植株生长和结瘤都受到显著抑制(图 6)。低磷处理时,沉默植株地上部分鲜质量比空载对照植株下降了 20%(图 7B),*AsPT6* 的低量表达抑制了磷向地上部分的转运;且沉默植株的根瘤鲜质量(图 7D)和固氮酶活(图 7F)下降了 50%,但根瘤数目没有明显差异,显示低磷条件下 *AsPT6* 的低量表达抑制了磷向根瘤的转运进而影响紫云英根瘤的发育和固氮功能;而高磷处理时,干扰植株与空载对照植株地上部分

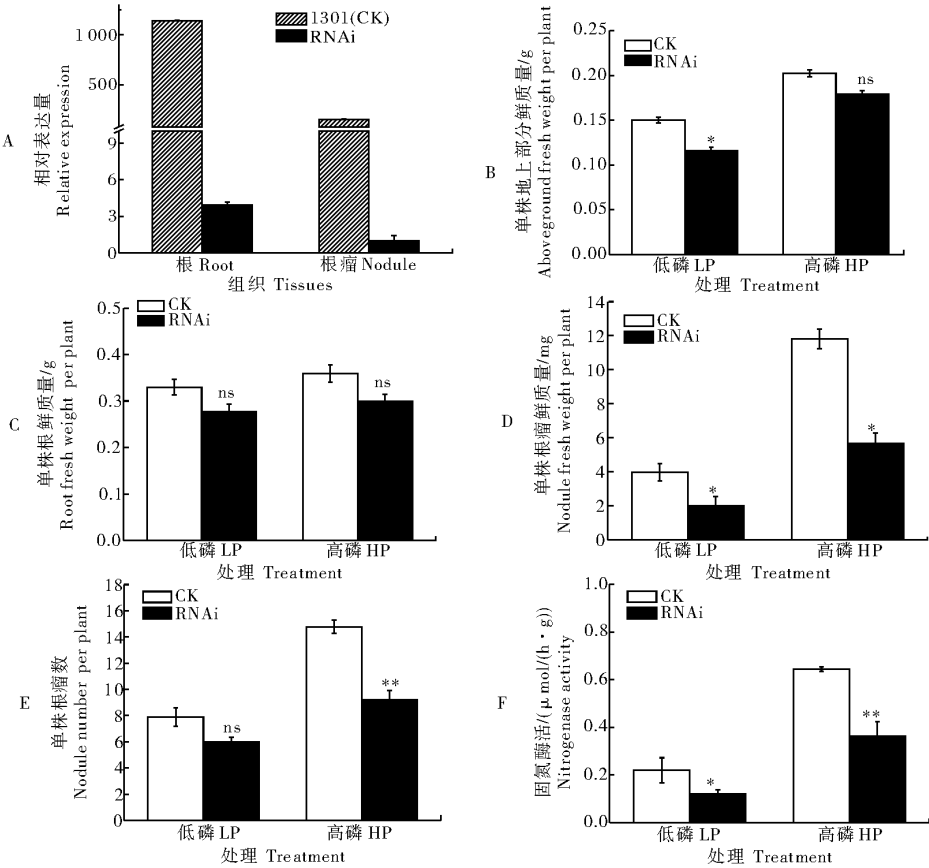
和根鲜质量没有显著变化(图 7B-C),推测紫云英中还有其他磷转运蛋白向地上部分转运磷;且与空载对照植株比较。RNAi 植株的根瘤鲜质量、根瘤数目以及根瘤的固氮酶活下降了 50%(图 7D-F);表明无论在低磷还是高磷条件下,*AsPT6* 的沉默都能显著抑制根瘤的发育和固氮酶活。

3 讨 论

植物可以通过对磷的再活化和转运等机制来响



图 6 抑制 *AsPT6* 表达对植株结瘤的影响
Fig.6 The effect of *AsPT6*-RNAi on nodulation



空载体 1301(CK)与 *AsPT6* 基因沉默(RNAi)植株在 LP(5 $\mu\text{mol/L}$)和 HP(1 mmol/L)2 种处理下鲜质量和结瘤数及固氮酶活统计, A:*AsPT6* 相对表达量; B:地上部分鲜质量; C:根鲜质量; D:根瘤鲜质量; E:根瘤数目; F:固氮酶活。RNAi:携带目的基因的植株; CK:携带空载的植株;每个处理有 9 株植株。显著性差异是相同磷浓度的 RNAi 和 CK 植株比较。Plant fresh and the nodule numbers and nitrogenase activity on empty vector (1301) and *AsPT6* transgenic plant (RNAi) at LP(5 $\mu\text{mol/L}$) and HP (1 mmol/L) condition. A:Relative expression of *AsPT6* in *A. sinicus* *AsPT6*-RNAi transgenic plant; B:The fresh weight of aboveground; C: The fresh weight of root; D: The fresh weight of nodule; E: The number of nodule; F: Nitrogenase activity; RNAi: *A. sinicus* transgenic plant carrying target gene; CK: *A. sinicus* transgenic plant carrying empty vector; There were nine plants for each treatment .Asterisk indicate significant differences of the same trait between RNAi and CK in same P level in *t* test.

图 7 *AsPT6*-RNAi 对紫云英结瘤固氮的影响

Fig.7 The effect of *AsPT6*-RNAi on nodulation and nitrogen fixation

应磷缺乏,磷的吸收和转运是通过磷转运蛋白进行的^[30]。其中 *Ph1* 家族磷转运蛋白主要起到向其他组织中转运磷的作用^[31]。进化分析显示 *AsPT6* 和 *GmPT5* 的同源性最高,推测该基因可能和 *GmPT5* 具有相似功能。不同组织 *AsPT6* 表达检测显示不接菌时紫云英 *AsPT6* 主要在地上部分表达,且组织定位也在维管组织中检测到 *AsPT6* 的表达,说明 *AsPT6* 主要起到向地上部分转运磷的作用。在低磷条件下,*AsPT6* 沉默植株地上部分生物量显著降低;高磷条件下,*AsPT6* 的超表达能提高植物地上部分生物量,进一步证实 *AsPT6* 与磷向地上部分的转运有关。而在低磷条件下 *AsPT6* 的超表达并没有显著影响植物的生物量,说明在低磷处理时植物吸收磷的缺乏使向地上部分转运磷量减少,植

物因缺磷而生长受到抑制,AsPT6超表达对植株的影响并不显著。

AsPT6在根和根瘤中同样也有表达。在接种根瘤菌后,该基因在根中的表达量上升,而在茎叶中的表达量显著下降;在根瘤成熟及发育后期,该基因在根和根瘤的维管组织中大量表达,说明在根瘤形成发育过程中AsPT6能将根中的磷向根瘤转运;在根瘤发育后期AsPT6的表达量要高于早期,表明紫云英的根瘤在发育不同时期对磷的需求量不一样,成熟固氮的根瘤需要更多的磷来维持根瘤的功能。AsPT6的超表达和沉默结果同样也显示AsPT6影响根瘤的发育,同时还对根瘤的固氮酶活产生影响。在高磷条件下,AsPT6的超表达和沉默都会显著影响根瘤的鲜质量、固氮酶活和根瘤数。进一步证实,AsPT6通过向根瘤转运磷进而影响到根瘤的形成和发育,AsPT6的表达在紫云英的结瘤固氮以及植株生长中起着重要作用。

AsPT6是紫云英中的非菌根特异性的磷转运基因,其表达能促进低磷条件下紫云英的结瘤固氮。但是对于磷转运蛋白向根瘤中转运磷是否具有普遍性以及磷转运蛋白是否与其他蛋白共同作用而影响植物结瘤固氮还需要进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] CADISCH G, SYLVESTER-BRADLEY R, N SBERGER J. ^{15}N -based estimation of nitrogen fixation by eight tropical forage-legumes at two levels of P:K supply[J]. Field Crops Res, 1989, 22(3): 181-194.
- [2] GRAHAM P H, VANCE C P. Legumes: importance and constraints to greater use[J]. Plant physiology, 2003, 131(3): 872-877.
- [3] LINDSTROM K, MURWIRA M, WILLEMS A, et al. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia[J]. Res Microbiol, 2010, 161(6): 453-463.
- [4] 梅江鹏, 李豪, 张忠明. 拟南芥中根瘤共生基因线路的搭建及其表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 28-33.
- [5] 杨倩倩, 刘元, 陈大松, 等. 蒺藜苜蓿中1个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 62-70.
- [6] 汪涛, 冯勇, 张忠明. 百脉根 LjSERKs 基因家族在根瘤共生中的功能鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 9-15.
- [7] DANIEL W I. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus[J]. Physiologia plantarum, 1993, 88(2): 294-300.
- [8] CORDELL D, DRANGERT J O, WHITE S. The story of phosphorus: global food security and food for thought[J]. Global environmental change, 2009, 19(2): 292-305.
- [9] CALDERÓN-VÁZQUEZ C, RUAIRIDH J H S, HERRERA-ESTRELLA L. Phosphate deprivation in maize: genetics and genomics[J]. Plant physiology, 2011, 156(3): 1067-1077.
- [10] JAKOBSEN I. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*) [J]. Physiologia plantarum, 1985, 64(2): 190-196.
- [11] ISRAEL D W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation [J]. Plant physiology, 1987, 84: 835-840.
- [12] TANG C, HINSINGER P, DREVON J J, et al. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* [J]. Ann Bot, 2001, 88: 131-138.
- [13] YANG Y. The effect of phosphorus on nodule formation and function in the casuarina-frankia symbiosis [J]. Plant soil, 1995, 176(1): 161-169.
- [14] ALMEIDA J F, HARTWIG U A, FREHNER M, et al. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N fixation in white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. J Exp Bot, 2000, 51(348): 1289-1297.
- [15] DREW E A, MURRAY R S, SMITH S E, et al. Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes[J]. Plant soil, 2003, 251: 105-114.
- [16] SMITH S E, SMITH F A, JAKOBSEN I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses[J]. Plant physiology, 2003, 133(1): 16-20.
- [17] RAGHOTHAMA K G. Phosphate acquisition[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 665-693.
- [18] 郑璐, 包媛媛, 张鑫臻, 等. 植物磷转运蛋白基因的研究进展[J]. 生态环境学报, 2017, 26(2): 342-349.
- [19] STEPHEN R M, ANNE L R, EUGENE D, et al. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2002, 31(3): 341-353.
- [20] TIAN J, VENKATACHALAM P, LIAO H, et al. Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Planta, 2007, 227(1): 151-165.
- [21] MARYAM N E, MIYAKO K, KIEN H N, et al. Adaptation of the symbiotic *Mesorhizobium* - chickpea relationship to phosphate deficiency relies on reprogramming of whole-plant metabolism [J]. PNAS, 2016, 113(32): E4610-E4619.
- [22] 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]. Plant J, 2009, 57(5): 798-809.
- [23] 陈丽玉, 秦璐, 赵静, 等. 豆科植物 Pht1 磷转运蛋白家族基因的研究进展[J]. 大豆科学, 2015, 34(6): 1057-1065.

[24] QIN L,ZHAO J,TIAN J,et al. The high-affinity phosphate transporter *GmPT5* regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean [J]. *Plant physiology*,2012,159(4): 1634-1643.

[25] MAEDA D,ASHIDA K,IGUCHI K,et al. Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis [J]. *Plant cell physiology*,2006,47(7): 807-817.

[26] JONES D H,WINISTORFER S C. A method for the amplification of unknown flanking DNA: targeted inverted repeat amplification[J].*Biotechniques*,1993,15(5): 894-904.

[27] SCOTTO-LAVINO E,DU G,FROHMAN M A. 3' end cDNA amplification using classic RACE [J]. *Nat Protoc*,2006,1(6): 2742-2745.

[28] TATJEWSKI P. Iterative optimizing set-point control- the basic principle redesigned[J]. *IFAC proceedings volumes*,2002,35(1): 49-54.

[29] KARANDASHOV V,NAGY R,WEGM LLER S,et al. Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *PNAS*,2004,101(16): 6285-6290.

[30] SHEN J,YUAN L,ZHANG J,et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant [J]. *Plant physiology*,2011,156(3): 997-1005.

[31] QIN L,GUO Y X,CHEN L Y,et al. Functional characterization of 14 Pht1 family genes in yeast and their expressions in response to nutrient starvation in soybean [J]. *PLoS One*,2012,7(10): e47726.

Effects of phosphorus transport protein AsPT6 on nodulation and nitrogen fixation in *Astragalus sinicus*

CHEN Chong LI Youguo ZHAO Bin LIN Hui

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

Abstract Phosphorus is an important element required for plant growth. The absorption and transportation of Pi are carried out by phosphate transporter in legumes. In this paper,phosphate transporter AsPT6,a new member of pht1 family, was identified in *Astragalus sinicus*. *AsPT6* was expressed in leaves, stems and roots. The expression of *AsPT6* was increased significantly in the roots and nodules when inoculated with *Mesorhizobium huakuii* 7653R. The results of tissue localization showed that *AsPT6* was expressed in the vascular tissue of roots,nodules,and the junctions between root and nodule,indicating that *AsPT6* may play a role in transporting phosphate from the root to nodule. Overexpression and RNA silence of *AsPT6* significantly affected the nodulation and nitrogenase activity of nodules. It is indicated that *AsPT6* is involved in the transportation of phosphorus during the formation and development of nodules.

Keywords *Astragalus sinicus*; *Mesorhizobium huakuii*; nodulation; phosphate transporter; Pht1 family

(责任编辑:张志钰)