

崔智强, 谢丽萍, 李友国, 等. 蒺藜苜蓿紫色酸性磷酸酶 *MtPAP3* 基因在共生固氮中的功能[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 29-37.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.005

蒺藜苜蓿紫色酸性磷酸酶 *MtPAP3* 基因在共生固氮中的功能

崔智强, 谢丽萍, 李友国, 林会

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

摘要 利用启动子组织表达定位、超表达及 CRISPR/Cas9 基因敲除等方法对蒺藜苜蓿酸性磷酸酶 *MtPAP3* 基因的功能进行研究。结果显示: *MtPAP3* 在蒺藜苜蓿根和根瘤的维管束组织以及根瘤的分生区和侵染区中表达, 在低磷胁迫和根瘤中均表现为特异性诱导后的高效表达; 超表达 *MtPAP3* 能够显著提高蒺藜苜蓿的结瘤数及根瘤固氮酶活, 敲除 *MtPAP3* 基因能显著抑制根瘤的发育及固氮酶活。结果表明: *MtPAP3* 参与低磷胁迫条件下根瘤中的磷代谢及共生固氮过程。

关键词 根瘤菌; 蒺藜苜蓿; 酸性磷酸酶; 低磷胁迫; 共生固氮

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0029-09

氮和磷是植物生长所必需的重要元素, 它们直接或间接地参与植物多种生理和生化过程, 在植物生长和发育过程中发挥着重要作用^[1]。植物的许多新陈代谢活动如能量产生、核酸生成、光合作用、呼吸作用、糖酵解过程、生物膜合成与组装、氧化还原反应等都离不开氮和磷^[2]。农业耕地中氮、磷较低的利用率已成为限制作物生长和产量的主要因素^[3]。

豆科植物的根瘤是一个富含磷的植株组织, 且根瘤中的磷含量是根和叶中磷含量的 3 倍多, 表明植物各组织中的磷优先供给根瘤^[4-6]。当豆科植物生长所需磷源供给不足时, 体内的磷储备优先供给根瘤, 以保证根瘤中共生固氮所需磷含量不受太大的影响^[7-8]。低磷条件下, 许多参与有机磷化物循环利用的基因大量表达, 其中酸性磷酸酶是维持根瘤内磷平衡最重要的成员^[9-11]。分泌型的酸性磷酸酶, 可被分泌到根外, 分解土壤中不能被植物吸收利用的有机磷^[12]; 而定位于细胞内的酸性磷酸酶, 可能参与细胞内磷的生理平衡, 尤其在细胞内有机磷化物的分解和重吸收中发挥着关键作用^[13-14]。尽管响应磷饥饿信号相关的植物基因已经得到广泛研究^[15-18], 但是维持低磷胁迫下豆科植物根瘤中磷稳

态的分子机制研究却少有报道。

本研究基于蒺藜苜蓿表达谱数据, 发现 PAP 家族中的 *MtPAP3* 基因不仅在低磷胁迫的根中诱导表达, 在低磷胁迫下根瘤中的表达量也显著增加, 表明该基因可能参与共生固氮中的磷代谢。为了进一步确定 *MtPAP3* 在共生固氮中的功能, 采用启动子组织表达定位、基因超表达和 CRISPR/Cas9 基因敲除等方法分析转基因植株的共生表型, 旨在探索该基因在蒺藜苜蓿根瘤磷代谢中的功能, 同时也为培育适应低磷土壤环境的豆科作物育种提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) A17、发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* MSU440、苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 1021 均来自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; 启动子组织化学定位载体 DX218G-mCherry、超表达载体 pLjU6-sGFP、CRISPR 载体 pBluescript-LjU6 和 pCambia1300-sGFP-Cas9 来自华中农业大学农业微生物学国家重点实验室曹扬荣教授课题组。

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0201006); 国家自然科学基金项目 (31670243); 华中农业大学科技创新基金项目 (2662017PY052, 2662017PY121)

崔智强, 硕士研究生. 研究方向: 生物固氮与菌植互作. E-mail: 540245764@qq.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授. 研究方向: 生物固氮与菌植互作. E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

1.2 盆栽试验

挑选颗粒大且饱满的蒺藜苜蓿种子,用刀片在种皮表面轻轻划出划痕,然后将其移至 100 mL 无菌的三角瓶中,再倒入 2% 的次氯酸钠,轻微振荡三角瓶 3~5 min,对种子表面灭菌,直至种皮划痕变成褐色破裂伤口,弃废液,无菌水冲洗种子 10 次,消除种子表面次氯酸钠残留;最后留少许无菌水淹没种子,置于 4 °C 冰箱暗处理春化 2~3 d;将吸胀的种子移至 FM 平板上,平板倒置 28 °C 黑暗处理 10~12 h,此时种子已经长出约 1 cm 的胚根,然后将发芽的种子移至含有无菌沙的花盆中,分别进行接菌和不接菌 2 种处理;接菌组分别浇灌无氮营养液(nitrogen-free nutrient solution, NFS)和低磷无氮营养液(low phosphate nitrogen-free nutrient solution, LP-NFS),其中无氮营养液含 136 mg/L KH_2PO_4 ,低磷无氮营养液含 0.68 mg/L KH_2PO_4 ;不接菌组分别浇灌 Hoagland 营养液和低磷 Hoagland 营养液(LP-Hoagland),其中 Hoagland 营养液含 136 mg/L KH_2PO_4 ,低磷霍格兰氏营养液含 0.68 mg/L KH_2PO_4 ,幼苗放置于光照室(16 h 光照 25 °C, 8 h 黑暗 21 °C)培养。

1.3 蒺藜苜蓿 DNA 和 RNA 的提取

采用天根公司植物 DNA 提取试剂盒(Plant DNA mini kit)提取各组织总 DNA,采用艾德莱公司植物总 RNA 提取试剂盒(TRIpure Reagent)提取各组织总 RNA。

1.4 RT-PCR 分析

将提取到的 RNA 采用诺唯赞公司 M-MLV (H-)反转录酶获得 cDNA;按照翊圣公司 qPCR 试剂盒(qPCR SYBR Green Master Mix)进行基因表达分析,以转录延伸因子 *EF-1 α* 作为内参基因,上游引物:ACTGGTGGTTTTGAAGCTGGT,下游引物 TGGTGGACCTCTCAATCATGT;目的基因 *MtPAP3* 的上游引物:TGGTGGAAAGGGAGCTTCGT,下游引物 GCTGCATAAACCTTCCCCAC。

1.5 启动子克隆及组织表达定位载体构建

从 NCBI 和 phytozom v 11.0 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 中检索到 *MtPAP3* 编码区(medtr6g013050)上游 986 bp 的启动子序列,分别设计含有 *Pst* I 和 *Sal* I 酶切位点的上下游引物,以低磷胁迫处理 7 d 的根部基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,引物如下:

MtPAP3ProF:

AACTGCAGTTTGTATTTCGTTGCTTCCAAATAC;

MtPAP3ProR:

GCGTCGACTGTGTTGAATTGGATCCTCTAATGA。

用 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切 *MtPAP3* 启动子 PCR 产物,回收片段,并连接到 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切过的启动子组织定位载体 DX218G-mCherry,将 *MtPAP3* 启动子片段置于 *GUS* 报告基因 N 端。

1.6 *MtPAP3* 编码区克隆及超表达载体构建

从 NCBI 数据库中查询到 *MtPAP3* (medtr6g013050)1 689 bp 的编码区序列,分别设计含有 *Xba* I 和 *Asc* I 酶切位点的上下游引物,以根瘤 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,引物如下:

MtPAP3OEF:

GCTCTAGAATGAAAATATGCAATTTTTGCA;

MtPAP3OER:

TTGGCGCGCCTTAATCCTTAAATCTAATCTGATTAC。

用 *Xba* I 和 *Asc* I 双酶切 *MtPAP3* 编码区 PCR 产物,回收片段,并连接到 *Xba* I 和 *Asc* I 双酶切过的超表达载体 pLjU6-sGFP,将 *MtPAP3* 编码区置于百脉根泛素启动子 C 端。

1.7 sgRNA 引物序列设计及 CRISPR/Cas9 敲除载体构建

在 CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/> CRISPR2/)网站中检索 *MtPAP3* 的 sgRNA 序列,依据网站提供的靶位点区域、GC 含量、潜在脱靶率以及综合得分筛选出 3 个候选靶位点,设计 sgRNA 序列:

MtPAP3 gRNA1:

TTTGACTCATCACTGCGAAGAGG;

MtPAP3 gRNA2:

ACTTGCTATGACTCATCCAAGG;

MtPAP3 gRNA3:

GACATGATGAATAATACCAGAGG。

CRISPR/Cas9 敲除载体的构建以 PTG 作为模板,获得 tRNA-gRNA 多顺反子,通过 Gibson 拼接与中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6 连接,最后连接到 pCambia1300-sGFP-Cas9 载体^[19]。

1.8 蒺藜苜蓿毛根转化

1) 种子处理。将表面含有划痕的种子在 2% 次氯酸钠中消毒 5 min,弃废液,用无菌去离子水漂洗种子 8 次,最后预留些许水淹没种子即可,置于 4 °C 春化 2~3 d,然后将吸胀的种子铺至 FM 固体培养基,倒置 28 °C 催芽 10~12 h,此时种子长出约 1 cm 的胚芽,待用。

2) 农杆菌侵染与阳性毛根鉴定。用无菌的手术刀切下胚芽根尖, 将根尖伤口刮取少量平板上含有目标质粒的发根农杆菌 *Ag. rhizogenes* MSU440 菌落, 置于 FM 培养基上共培养 7 d, 然后用无菌手术刀切除根尖伤口处长出的非阳性根, 将幼苗移至 HRE 固体培养基上生根 10~15 d; 在体式荧光显微镜下, 通过 GFP 荧光筛选阳性植株。

3)根瘤菌接种盆栽试验。鉴定的阳性幼苗常温炼苗1 d;随后将幼苗移栽至盛有无菌沙的盆钵中,浇灌LP-NFS营养液,放置光照培养箱;待幼苗生长3~5 d后,接种根瘤菌 *S. meliloti* 1021,3~4 周后观察并统计共生表型。

1.9 组织化学染色

1) 20 mL GUS 染色工作液配置。将 14.6 mL 50 mmol/L PBS 缓冲液、400 μ L 0.5 mmol/L EDTA、1 mL 10 mg/mL X-Gluc、20 μ L Triton X-100、4 mL 甲醇以及 0.084 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 混合。

2)GUS 染色。将收获的根和根瘤清洗干净,加

入 GUS 染液, 37 °C 孵育过夜, 最后用 PBS 缓冲液冲洗表面浮色, 置于光学显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 MtPAP3 蛋白质序列分析和系统发育树构建

利用 NCBI 和 Uniprot 数据库分析可知, 蒺藜苜蓿酸性磷酸酶基因 *MtPAP3* (medtr6g013050) 全长 4 132 bp, 其中编码区 1 689 bp, 编码 587 个氨基酸残基的蛋白质, 分子质量为 66.16 ku, PI 值为 6.14。蛋白结构分析显示 *MtPAP3* 蛋白含有特异的金属磷酸酶结构域以及行使激活功能的活性位点。将 *MtPAP3* 蛋白质序列与拟南芥、大豆、鹰嘴豆和水稻中的 PAP 蛋白序列进行序列比对和进化分析, 构建系统进化树 (图 1)。结果显示, *MtPAP3* 与 *GmPAP31* 同源性最高, 达到 77.68%, 预测 *MtPAP3* 与 *GmPAP31* 具有相似的功能, 可能参与低磷胁迫根瘤中的磷代谢。

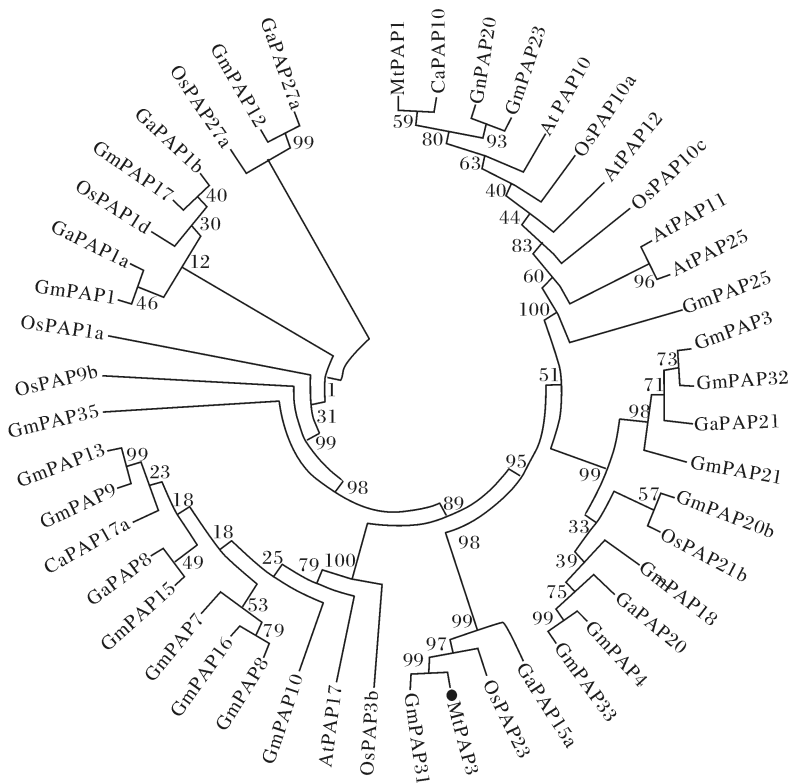


图 1 MtPAP3 系统进化树

Fig.1 Phylogenetic analysis of MtPAP3 with other PAPs

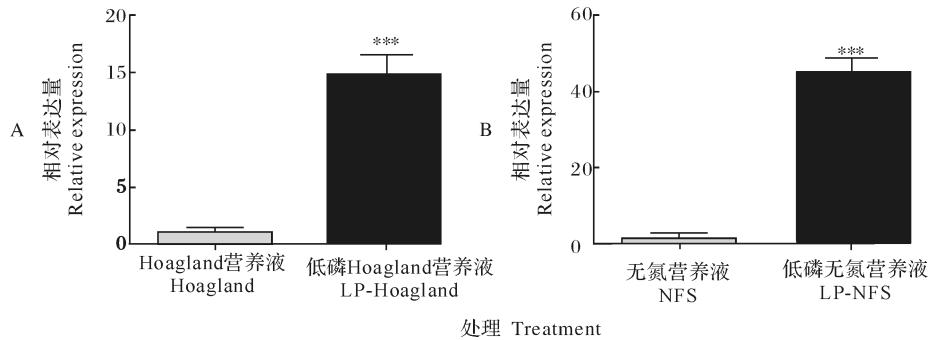
2.2 低磷胁迫对 MtPAP3 基因表达的影响

为了验证 *MtPAP3* 是否参与植物应对低磷胁迫且参与菝葜苣蓿根瘤中的磷代谢, 分别收取磷饥

饿处理 7 d 后的根和磷饥饿处理 21 d 后的根瘤样品, 抽取 RNA, 进行 RT-PCR 分析。结果显示: *MtPAP3* 在低磷 ($5 \mu\text{mol/L KH}_2\text{PO}_4$) 胁迫根中的

表达量是高磷处理下根中的 14.68 倍(图 2A);此外,*MtPAP3* 在 LP-NFS 处理后根瘤中的表达量是 NFS(含 1 mol/L KH_2PO_4)处理后根瘤中的 15.48 倍(图 2B),该基因在低磷胁迫的根和根瘤中表达量

均显著增加。这一结果暗示在低磷胁迫下,为维持根瘤共生中的磷稳态,植物大量表达 *MtPAP3* 来分解储藏于植物细胞内储存的有机磷,为根瘤的形成和固氮提供磷元素。



A: *MtPAP3* 在 LP(0.68 mg/L KH_2PO_4) 和 HP(浇灌 Hoagland 营养液, 136 mg/L KH_2PO_4) 处理下根中的表达量; B: *MtPAP3* 在 LP(0.68 mg/L KH_2PO_4) 和 HP(浇灌 无氮营养液, 136 mg/L KH_2PO_4) 处理下根瘤中的表达量。* 表示经过非配对 Student' *t*-test 分析, 试验组与对照组有显著性差异 ($P < 0.001$), 误差线代表平均值 ± 标准差, 数据是 3 次技术重复的平均值。A: Transcript levels of *MtPAP3* in roots after LP and HP treatments; B: Transcript levels of *MtPAP3* in nodules after LP and HP treatments. Asterisk (***) represents significant differences compared with control treatments (Student' *t*-test) ($P < 0.001$). Error bars represent means ± SD. Data are the averages of three technical replicates.

图 2 低磷处理下 *MtPAP3* 在根和根瘤中的转录水平

Fig.2 Transcript levels of *MtPAP3* in uninoculated roots after LP treatment for 7 d and inoculated nodules after LP treatment for 21 d

2.3 *MtPAP3* 组织表达定位

为了检测 *MtPAP3* 基因在根及根瘤中的表达定位,构建了 *MtPAP3*pro::GUS 的组织表达定位载体,利用 GUS 报告基因检测 *MtPAP3* 在蒺藜苜蓿根瘤不同部位中的表达。结果显示:*MtPAP3* 在 LP-NFS(含 5 $\mu\text{mol/L}$ KH_2PO_4) 处理 28 d 后的根尖和根的中柱中均有表达(图 3A、B),且在根瘤维管束、根瘤与根接触部位的维管束中强烈表达(图 3C、D),这些表达定位的结果进一步表明 *MtPAP3* 与根瘤形成和发育过程中的磷代谢分配有关。

2.4 *MtPAP3* 对共生固氮的影响

为了进一步探索 *MtPAP3* 在共生固氮中的功能,分别构建了超表达(OE)和敲除(CRISPR/Cas9)载体,通过蒺藜苜蓿毛根转化获得相应的转基因植株,浇灌 LP-NFS 营养液,接菌 28 d 后分别检测 2 组植株的共生固氮表型。*MtPAP3* 基因超表达结果显示,超表达植株地上长势较好,地下根部较长且密集,根瘤大且数量较多(图 4)。

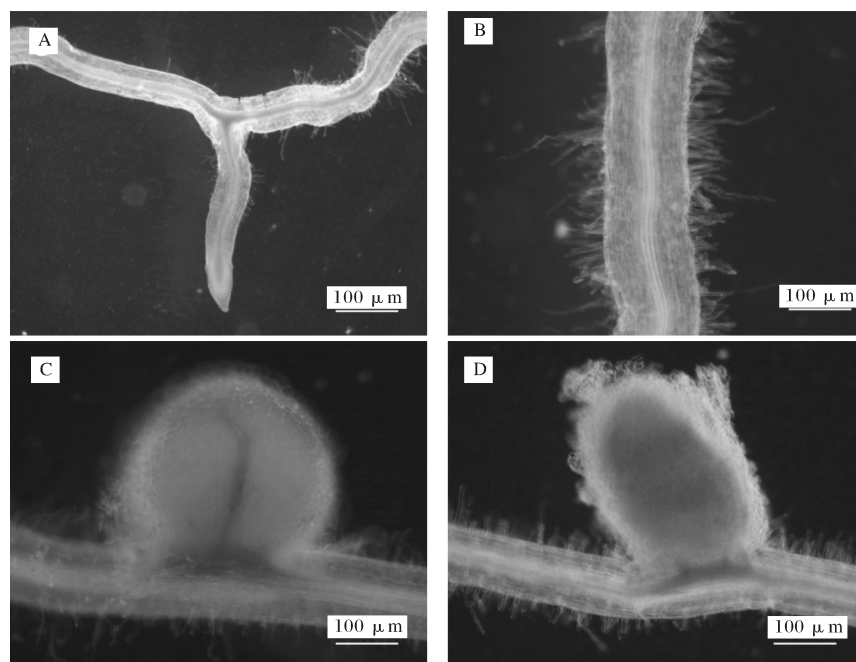
对植株结瘤表型统计结果显示,超表达植株地上鲜质量、固氮酶活、根瘤数量和根瘤鲜质量均高于空载体对照组植株(图 5),说明低磷胁迫条件下, *MtPAP3* 基因的过量表达能促进根瘤形成和发育,

提高固氮酶活,进一步促进地上部分的生长。

MtPAP3 基因敲除结果显示, *MtPAP3* 敲除植株地上部长势较差,地下根部较短且根瘤较小(图 6)。

对植株结瘤表型统计结果显示, *MtPAP3* 敲除植株的鲜质量和固氮酶活均显著下降,根瘤数量和根瘤鲜质量没有显著性差异(图 7),说明 *MtPAP3* 基因的敲除影响到根与根瘤中磷的平衡与分配,导致根瘤因缺磷而固氮酶活下降,进而影响植株的生长。

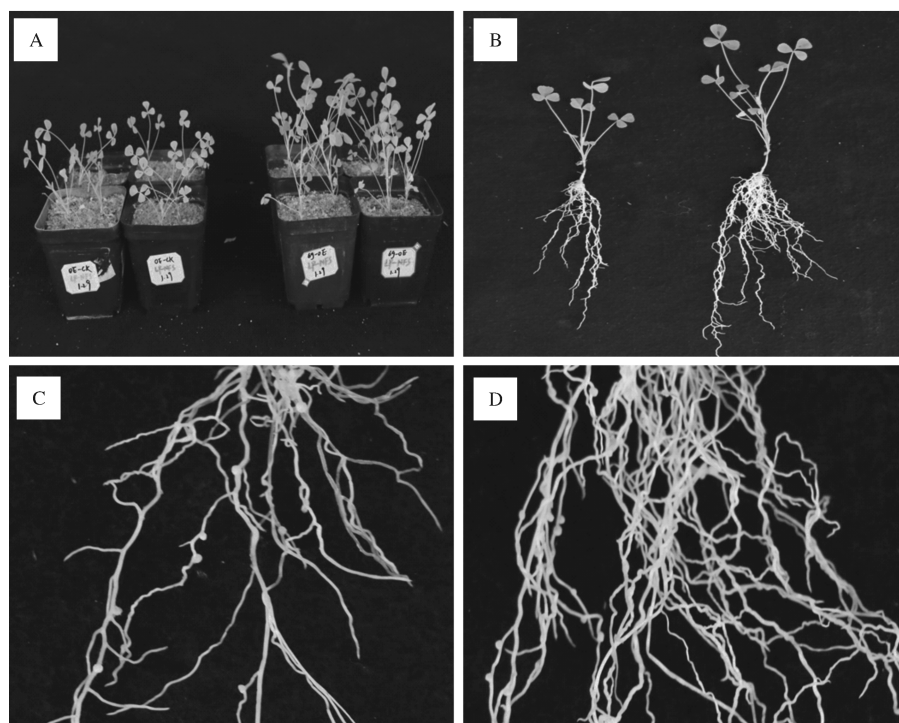
为了进一步探究 *MtPAP3* 是否与根瘤的发育相关,随机挑选接菌 28 d 后空载体植株、*MtPAP3* 超表达植株和 *MtPAP3* 敲除植株根部 5~10 个根瘤,用 FAA 固定液进行包埋、纵切、苯胺蓝染色,置于体式光学显微镜下观察(图 8)。结果显示:与空载体对照植株相比,超表达植株根瘤固氮区含菌细胞较多且发育良好(图 8 B、E);而 *MtPAP3* 敲除植株根瘤内含菌细胞较少,分生区和侵染区基本没有含菌细胞,固氮区内含菌细胞多数发育不正常,形态不饱满,共生体膜明显皱缩,且周质空间增大(图 8 C、F),表明 *MtPAP3* 基因的超表达促进共生体根瘤的发育,而该基因的敲除抑制了植物机体内储存的磷元素向根瘤转运,严重影响根瘤的发育。



A、B、C 和 D 为 *MtPAP3* 在接菌 28 d 后根和根瘤中的启动子组织表达定位。A、B、C 和 D are histochemical location of *MtPAP3* in roots and nodules.

图 3 *MtPAP3* 在蒺藜苜蓿根瘤中的时空表达

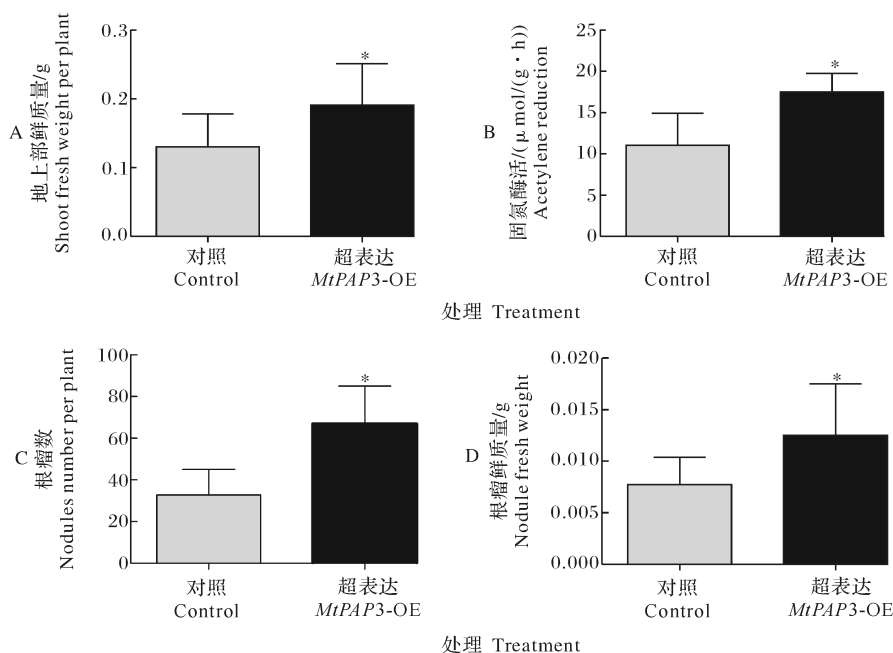
Fig.3 Temporal and spatial expression of *MtPAP3* in roots and nodules



A、B 分别为空载体对照植株(左)和 *MtPAP3*-OE 超表达植株(右)表型;C、D 分别为对照和超表达植株结瘤基本表型。Figure A、B are phenotype of control (left) and overexpression (right) transgenic plants. Figure C and D are basic appearance of nodules on control and over-expression transgenic plants, separately.

图 4 *MtPAP3* 超表达植株的结瘤表型

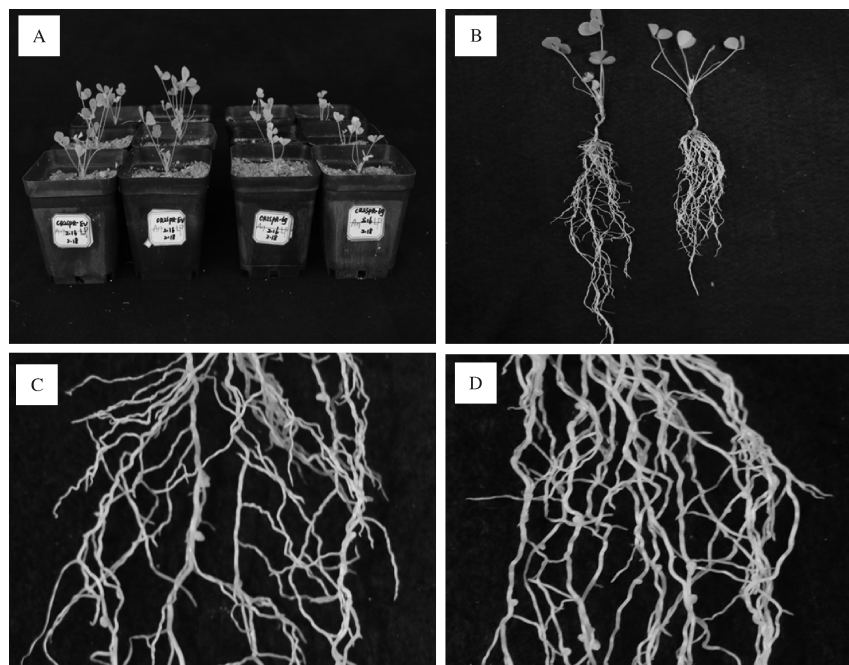
Fig.4 Phenotype of *MtPAP3*-overexpression transgenic plants



A:地上部鲜质量; B:固氮酶活; C:根瘤数; D:根瘤鲜质量。数据是3次技术重复的平均值($n=9$),通过非配对 Student' t -test 对超表达植株和对照植株间的数据进行统计分析(*: $P<0.05$),误差线代表平均值 $\pm$ 标准差。A. Shoot fresh weight per plant; B. Nitrogenase activity as determined by an acetylene reduction assay in transgenic control and *MtPAP3*-OE nodules; C. Nodule number per plant; D. Nodule fresh weight. Data are the averages of three technical replicates ($n=9$). The statistical significance of differences between transgenic control and *MtPAP3*-OE plants was determined using an unpaired two-tailed Student' t -test (*: $P<0.05$). Error bars represent means $\pm$ SD.

图 5 *MtPAP3* 超表达和对照植株共生表型测定

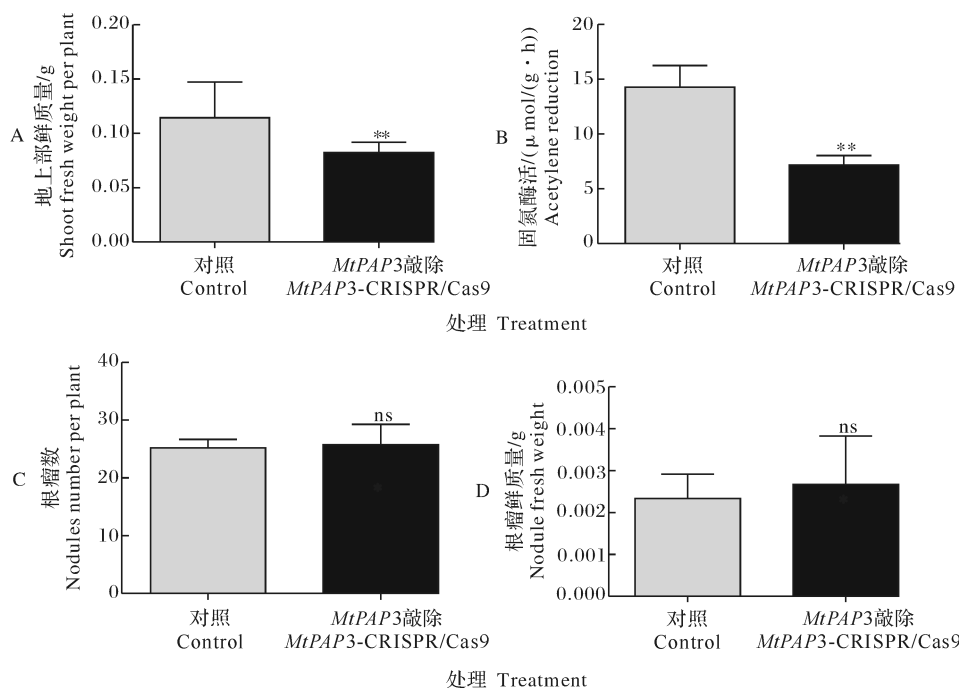
Fig.5 Symbiotic phenotype of *MtPAP3*-overexpressen(OE) transgenic plants



A 和 B 分别为空载体对照植株(左)和 *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 植株(右)基本表型,C 和 D 分别为空载体对照 control 和 *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 植株地下部分根瘤形态。Figure A,B are basic phenotype of control (left) and CRISPR/Cas9 (right) transgenic plants. Figure C and D are basic appearance of nodules on control and CRISPR/Cas9 plants.

图 6 *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 植株的结瘤表型

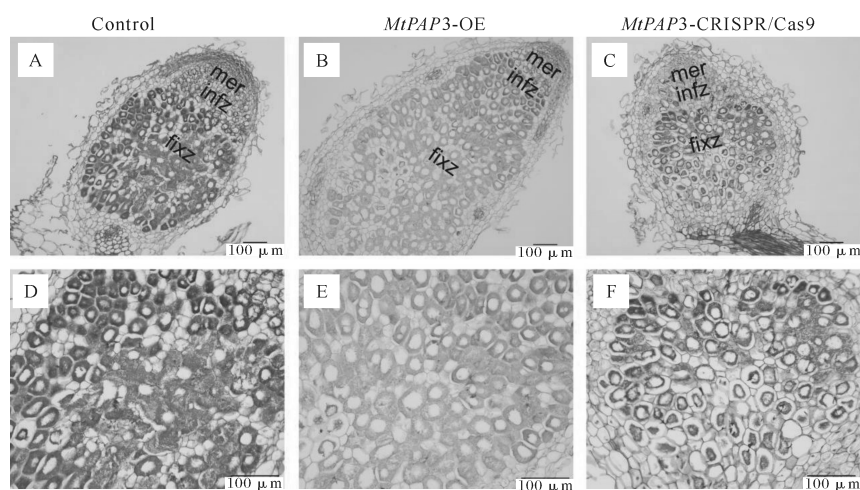
Fig.6 Phenotype of *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 transgenic plants



A:地上鲜质量; B: 固氮酶活; C:根瘤数; D:根瘤鲜质量。数据是3次技术重复的平均值($n=9$),通过非配对 Student' t -test 对 CRISPR/Cas9 植株和对照植株间的数据进行统计分析 (** : $P<0.01$; ns: 没有显著性差异),误差线代表平均值 $\pm$ 标准差。A. Shoot fresh weight per plant; B. Nitrogenase activity as determined by an acetylene reduction assay in transgenic control and *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 nodules; C. Nodule number per plant; D. Nodule fresh weight. Data are the averages of three technical replicates ($n=9$). The statistical significance of differences between transgenic control and *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 plants was determined using an unpaired two-tailed Student' t -test (** : $P<0.01$; ns: No significant difference). Error bars represent means $\pm$ SD.

图 7 *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 和对照植株共生表型测定

Fig.7 Symbiotic phenotype of *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 transgenic plants



A:空载体对照植株 28 dpi 根瘤纵切切片; B:超表达植株 28 dpi 根瘤纵切切片; C:CRISPR/Cas9 植株 28 dpi 根瘤纵切切片; D、E 和 F 分别为 A、B 和 C 中固氮区的局部放大; 图中 mer 表示分生区, infz 表示感染区, fixz 表示固氮区。A. Longitudinal section of a control 28 dpi nodule; B. Longitudinal section of a *MtPAP3*-overexpressed 28 dpi nodule. C. Longitudinal section of a *MtPAP3*-CRISPR/Cas9 28 dpi nodule. Figure D, E, and F are magnification of fixz in figure A, B and C separately. mer: Meristem; infz: Infection zone; fixz: Nitrogen fixation zone.

图 8 *MtPAP3* 超表达和 CRISPR/Cas9 植株根瘤石蜡切片

Fig.8 Nodules of *MtPAP3*-overexpression and CRISPR/Cas9 in transgenic plants

3 讨 论

磷是核酸、蛋白质和磷脂等生物大分子的重要组成部分^[19-20]。磷酸根离子是植物吸收磷的主要形式,但在土壤中分布不均且易与金属阳离子(Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+})形成难以被植物吸收利用的金属磷酸盐,造成土壤中的磷含量长期处于匮乏状态^[21]。为了应对这些不利于生长的环境因素,豆科植物进化出许多维持根瘤内磷稳态的策略,酸性磷酸酶活性增加是最重要的策略之一^[22-23]。系统进化树显示,*MtPAP3*与低磷胁迫根瘤中诱导表达的*GmPAP31*及磷饥饿根中诱导表达的*OsPAP23*和*CaPAP15a*具有较高的同源性,其中*GmPAP31*是*GmPAP*家族低磷胁迫根瘤中诱导上调表达最显著的成员,*OsPAP23*和*CaPAP15a*均在磷饥饿后表达量显著增加。此外,本研究表明,*MtPAP3*在低磷胁迫的根和根瘤中均强烈诱导表达,且主要在根和根瘤的维管束组织以及根瘤的分生区和侵染区中表达,说明该蛋白不仅参与根瘤内磷的分配,还参与磷的吸收利用。*MtPAP3*基因超表达和敲除植株共生表型显示,超表达植株地上部长势较好,固氮酶活较高,且根瘤发育良好,表明该蛋白酶活性的增加,使得更多的磷储备从植物各组织运送至根瘤,维持根瘤内的磷稳态。而*MtPAP3*敲除植株地上部长势较差,固氮酶活显著降低,且类菌体发育异常,共生体膜破裂,周质空间增大,表明*MtPAP3*磷酸酶活性的降低加重了根瘤内磷代谢的负担,造成运送到根瘤内的Pi、Fe、Zn等矿质元素大量减少,以至于类菌体形成发育所需大量元素无法及时供应,导致共生体生长发育异常,最终影响共生固氮,表明*MtPAP3*在调控低磷胁迫条件下根瘤磷代谢方面发挥着重要作用。笔者初步研究了*MtPAP3*在低磷胁迫根瘤中的共生表型,但是具体的分子机制还有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] SCHULZE J, TEMPLE G, TEMPLE S J, et al. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency[J]. *Ann Bot*, 2006, 98(4): 731-740.
- [2] ROSE T J, IMPA S M, ROSE M T, et al. Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: a critical review of root traits and their potential utility in rice breeding[J]. *Ann Bot*, 2013, 112(2): 331-345.
- [3] HARDARSON G, ATKINS C. Optimising biological N_2 fixation by legumes in farming systems[J]. *Plant and soil*, 2003, 252(1): 41-54.
- [4] 吴和涛, 谢婧, 罗莎, 等. 华葵中慢生根瘤菌焦磷酸硫酸素结合蛋白基因 *tpb* 的功能研究[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(3): 77-82. WU H T, XIE J, LUO S, et al. Function of thiamine pyrophosphate-binding protein gene *tpb* in *Mesorhizobium huakuii*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3): 77-82 (in Chinese with English abstract).
- [5] SULIEMAN S, VAN-HA C, SCHULZE J, et al. Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability[J]. *Journal of experimental botany*, 2013, 64(10): 2701-2712.
- [6] 陈冲, 李友国, 赵斌, 等. 磷转运蛋白 *AsPT6* 对紫云英结瘤及固氮酶活性的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(1): 50-58. CHEN C, LI Y G, ZHAO B, et al. Effects of phosphorus transport protein *AsPT6* on nodulation and nitrogen fixation in *As-tragalussinicus*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3): 77-82 (in Chinese with English abstract).
- [7] SULIEMAN S, FISCHINGER S A, GRESSHOFF P M, et al. Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of N_2 fixation in *Medicago truncatula* [J]. *Physiol plant*, 2010, 140(1): 21-31.
- [8] 徐金灵. 低磷胁迫调控大豆磷平衡和酸性磷酸酶活性的生理和分子机制[D]. 广州: 华南农业大学, 2017. XU J L. Physiological and molecular mechanisms underlying phosphate starvation regulated soybean phosphorus homeostasis and purple acid phosphatase activity [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [9] XUE Y, ZHUANG Q, ZHU S, et al. Genome wide transcriptome analysis reveals complex regulatory mechanisms underlying phosphate homeostasis in soybean nodules[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2024[2020-05-16]. <https://doi.org/10.3390/ijms19102924>.
- [10] 刘攀道, 黄睿, 许文茸, 等. 植物紫色酸性磷酸酶的研究进展[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(2): 410-416. LIU P D, HUANG R, XU W R, et al. Research progress of purple acid phosphatase in plants [J]. *Chinese journal of tropical crops*, 2019, 40(2): 410-416 (in Chinese with English abstract).
- [11] 魏铭, 王鑫伟, 陈博, 等. 植物紫色酸性磷酸酶基因家族功能研究进展[J]. *植物学报*, 2019, 54(1): 93-101. WEI M, WANG X W, CHEN B, et al. Research progress into the function of purple acid phosphatase gene family plants [J]. *Chinese bulletin of botany*, 2019, 54(1): 93-101 (in Chinese with English abstract).
- [12] KONG Y B, LI X H, WANG B, et al. The soybean purple acid phosphatase *GmPAP14* predominantly enhances external phytate utilization in plants[J/OL]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 292[2020-05-16]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00292>.
- [13] LI C, LI C, ZHANG H, et al. The purple acid phosphatase *GmPAP21* enhances internal phosphorus utilization and possibly plays a role in symbiosis with rhizobia in soybean[J]. *Physiologia plantarum*, 2017, 159(2): 215-227.

- [14] 邱文敏. 紫色酸性磷酸酶基因 OsPAP26、ZmPAP10a 及 ZmPAP26 的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016. QIU W M. Functional analysis of purple acid phosphatase genes OsPAP26, ZmPAP10a and ZmPAP26 [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [15] 苏顺宗, 刘丹, 吴玲, 等. 玉米低磷响应基因 ZmPAP18 的表达特征与序列变异分析[J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 509-516. SU S Z, LIU D, WU L, et al. Expression and sequence variation analysis of a low-phosphorus responsive gene ZmPAP18 in maize [J]. Molecular plant breeding, 2013, 11(4): 509-516 (in Chinese with English abstract).
- [16] 易双, 聂治, 张啸, 等. 玉米紫色酸性磷酸酶(PAPs)基因家族的鉴定与低磷响应特征[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(3): 281-290. YI S, NIE Z, ZHANG X, et al. Identification of maize (*Zea mays*) purple acid phosphatase (PAPs) genes family and their characterization responses to phosphorus starvation[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2015, 23(3): 281-290 (in Chinese with English abstract).
- [17] 陆玲鸿. 水稻紫色酸性磷酸酶 OsPAP10a 和 OsPAP10c 的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016. LU L H. Functional analysis of purple acid phosphatase OsPAP10a and OsPAP10c in rice [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [18] 林雁. 低磷调控大豆根系细胞壁蛋白的鉴定及 GmPAP1-like 的功能初探[D]. 广州: 华南农业大学, 2018. LIN Y. Identification of phosphate starvation regulated cell wall proteins in soybean roots and functional characterization of GmPAP1-like [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [19] 凌颖, 张婷婷, 端木德强, 等. 百脉根 *Rboh* 基因家族在共生固氮中的功能研究[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(1): 1-9. LING Y, ZHANG T T, DUANMU D Q, et al. Function of *Rboh* gene family in *Lotus japonicas* during symbiotic nitrogen fixation [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(1): 1-9 (in Chinese with English abstract).
- [20] RICHARDSON A E. Regulating the phosphorus nutrition of plants: molecular biology meeting agronomic needs[J]. Plant and soil, 2009, 322(1/2): 17-24.
- [21] VANCE C P, UHDE-STONE C, ALLAN D L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[J]. New phytologist, 2003, 157(3): 423-447.
- [22] SULIEMAN S, TRAN L S. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency[J]. Plant Sci, 2015, 239: 36-43.
- [23] 王建云. 二磷酸核苷磷酸酯酶 AsPPD1 在紫云英根瘤形成和共生固氮中的功能及机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015. WANG J Y. Function and mechanism characterization of diphosphonucleotide phosphatase AsPPD1 during nodule formation and symbiotic nitrogen fixation in *Astragalus sinicus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).

Symbiotic function of purple acid phosphatase gene *MtPAP3* in *Medicago truncatula*

CUI Zhiqiang, XIE Liping, LI Youguo, LIN Hui

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

Abstract This study investigated symbiotic function of purple acid phosphatase gene *MtPAP3* in *Medicago truncatula* with *MtPAP3*Pro::GUS histochemical location, over-expression and CRISPR/Cas9 gene knock-out. The results showed that *MtPAP3* was mainly located in vascular bundle of roots and nodules, and meristem and infection zone of nodules. The transcription levels of *MtPAP3* were enhanced in roots and nodules under Pi deficiency conditions. The numbers and nitrogenase activity of nodules were increased in transgenic overexpression plants. The knock-out of *MtPAP3* significantly inhibited the development and nitrogenase activity of nodules. It is indicated that *MtPAP3* involves in phosphorus metabolism and symbiotic nitrogen fixation in nodules under low phosphorus stress.

Keywords rhizobium; *Medicago truncatula*; acid phosphatase; phosphorus deficiency stress; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑: 张志钰)