

马尾松紫色酸性磷酸酶基因 *PmPAPI* 的克隆与表达模式分析

张 婷^{1,2}, 丁贵杰², 文晓鹏^{1*}

(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, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州大学林学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: [目的] 研究马尾松紫色酸性磷酸酶基因功能及其对低磷胁迫的应答。[方法] 采用 RACE 法克隆马尾松紫色酸性磷酸酶 (PAPs) 家族成员 *PmPAPI*, 利用软件和数据库, 对基因结构功能进行多重分析预测, 检测其接种外生真菌及低磷胁迫下的表达模式。[结果] 表明, *PmPAPI* 基因 cDNA 全长 2 520 bp, 开放阅读框 1 869 bp, 编码 622 个氨基酸残基, 具紫色酸性磷酸酶保守结构域特征, 属于高分子量 PAPs。PmPAPI 有信号肽, 无跨膜区, 推测定位于细胞质基质或细胞器基质中, 它与莲 (*Nelumbo nucifera*)、无油樟 (*Amborella trichopoda*) 的亲缘关系最近, 相似性分别达 71% 和 69%, 进化关系古老、保守性强。时空表达分析表明, *PmPAPI* 的表达受外生菌根诱导, 在不同组织中均有表达, 其根中的表达量显著高于茎和叶。在菌根化和非菌根化的幼苗中, *PmPAPI* 的表达均受基质中磷含量的影响, 表现为低磷条件下高效激活, 高磷条件下其表达反而受到抑制。低磷胁迫下根系中酸性磷酸酶活性持续增高, 说明其活性与磷供给水平和时间有相关性。[结论] 首次克隆鉴定了 1 个受外生菌根诱导的马尾松紫色酸性磷酸酶基因, 其参与了对低磷胁迫的应答, 为深刻认识马尾松耐低磷的分子机制、遗传改良提供了新信息和新思路。

关键词: 马尾松; 外生菌根; 紫色酸性磷酸酶基因; 表达分析
中图分类号: S791.248 文献标识码: A

Cloning and Expression Pattern Analysis of Ectomycorrhizal Purple Acid Phosphatase Gene in *Pinus massoniana* Lamb.

ZHANG Ting^{1,2}, DING Gui-jie², WEN Xiao-peng¹

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

Abstract: [Objective] To study the function of purple acid phosphatase gene and the response of phosphorus deficiency stress in Masson pine (*Pinus massoniana*). [Methods] The full-length sequence of PAP gene (*PmPAPI*) was cloned from this germplasm by RACE methodology, subsequently, multiple alignments of amino acid sequences, construction of phylogenetic tree, as well as the bioinformatics analysis were carried out. [Results] The results showed that *PmPAPI* was obtained (GenBank accession number: KT390746), whose full-length cDNA sequence was 2,520 bp and the corresponding lengths of open reading frames (ORF) was 1,869 bp, which contained 622 amino acid residues, including a typical conserved domain and belonged to a high molecular weight protein. *PmPAPI* had signal peptide and non-transmembrane domain, thus, it was presumably localized in matrix of cytoplasm or organelles, which demonstrated high homology with *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *Amborella trichopoda*

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 国家 863 子项目(2011AA10020301), 贵州省重大专项(20126011-1)。

作者简介: 张 婷, 女, 博士研究生。研究方向: 林木生理生化与分子生物学。E-mail: gyzhangting@163.com。

* 通讯作者: 文晓鹏, 博士, 教授。研究方向: 林木生物技术及遗传育种。E-mail: xpwensc@hotmail.com

Baill., reflecting the considerably ancient and strict conservation during the evolutionary process. The temporal and spatial expression profiles showed that the expression level of *PmPAPI* was induced by ectomycorrhizal symbiosis, which was expressed in different tissues of *P. massoniana*, the expression level of root was significantly higher than that of stem and leaf. The expression of *PmPAPI* was correlated with the phosphorus status of soil in both non-and ectomycorrhizal plants, and its expression might be intensively up-regulated by low phosphorus stress; conversely, high phosphorus level inhibited its expression. Further, the activity of acid phosphatase continued to rise in roots under low phosphorous stress, indicating that the acid phosphatase was time-dependent on the low phosphorus supply. [Conclusion] A *PmPAPI* was cloned and characterized for the first time from *P. massoniana*, especially its enhanced expression pattern by ectomycorrhizal symbiosis under low phosphorus stress, which provided new information about the role of ectomycorrhizal fungi.

Keywords: *Pinus massoniana*; ectomycorrhizal fungi; purple acid phosphatase gene; Expression pattern analysis

磷是植物体生长发育、生理代谢等过程中所必需的营养元素,但土壤中能有效利用的磷含量却很低,因此植物形成了多种耐低磷适应机制,较重要的一种方式是通过诱导产生磷酸酶来提高植物磷素的利用率,其中紫色酸性磷酸酶(Purple acid phosphatases, PAPs)是普遍存在于植物体内的酸性磷酸酶(Acid phosphatases, ACPs)类。植物紫色酸性磷酸酶具有双金属离子中心^[1],属于金属水解磷脂酶,其羧基端含有一个保守结构域,由5个保守基序、7个金属配对氨基酸残基构成(DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXH)^[2],在酸性环境下能有效催化磷酸酯或酸酐的水解,释放出能被植物利用的磷酸盐^[3-5]。根据国内外研究表明,已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh.)、大豆(*Glycine max*(L.) Merr.)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mil.)、水稻(*Oryza sativa* L.)等植物中分离、鉴定出紫色酸性磷酸酶基因,发现大部分PAPs基因的表达受低磷胁迫诱导^[6-7],且在缺磷条件下植物根际酸性磷酸酶的分泌以及植物体内紫色酸性磷酸酶活性均显著性提高,对活化植株根际周围的有机态磷和促进植株体内磷素的再循环利用有重要作用^[8-9]。除此之外,在不同植物的生长发育过程中,PAPs具有多种生物学功能,在保护细胞壁合成和抑制氧化胁迫^[10-11]、花的发育和种子的萌发^[12]、植物防御病菌侵染^[13-15]等方面也发挥了重要作用。

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)作为中国东南部的的主要树种,有速生、用途广等优点,是典型的外生菌根(Ectomycorrhizal fungi, ECM)树种^[16]。它是少数无根毛植物,其根系与大量外生菌根真菌共生,形成的外生菌根上有丰富的外延菌丝和菌套结构,替代了根毛的作用,促进马尾松对磷以及其他营

养物质的吸收,在马尾松耐低磷机制中起着重要作用。迄今为止,马尾松紫色酸性磷酸酶基因的克隆及表达分析尚属空白,特别是外生菌根对其表达的影响未见报道。不同种源马尾松对低磷胁迫的遗传反应有显著性差异^[17],本研究利用耐低磷的优良马尾松家系,克隆和鉴定出受外生菌根诱导的马尾松紫色酸性磷酸酶基因,分析其在不同磷条件、不同组织中的基因表达模式,探讨了该基因对低磷响应的分子机制,旨在为马尾松磷高效分子育种提供优良的候选基因,对提高马尾松磷素利用效率和对低磷环境的适应能力具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料及菌根真菌处理

试验材料选择四川眉山市丹棱县杨场镇生长势强健、耐低磷的优良马尾松家系,2012年采集20年生植株种子,前期研究表明,该家系耐低磷能力强(未发表),2013年在贵州大学温室中培育1年生实生苗。供试土壤采自贵州贵阳市孟关林场,采集距土层50 cm下的土壤作为育苗基质,pH为5.4,有机质 $4.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 $0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,碱解氮 $37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷 $2.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,全钾 $4.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,属低磷、低钾黄壤土。喷洒甲醛,闷盖塑料膜一周后,用细筛进行筛选, $124^{\circ}\text{C} \sim 126^{\circ}\text{C}$ 灭菌1 h,晾晒1 d,然后再灭菌1次,待冷却后装入经高锰酸钾灭菌(24 h)育苗盘和培养钵,另备高温高压灭菌的珍珠岩用作盖土。

试验菌种包括美味牛肝菌(*Boletus edulis*(Bull: Fr.),北京农学院曹庆芹教授惠赠)和彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*(Pers.) Coker et Couch, 贵州大

学植物生理实验室惠赠)。菌剂侵染采用三层侵染法,距基质表面 2/3 处理入固体菌剂;据 1/3 处喷洒液体菌剂,表层直接用液体与固体菌剂混合侵染马尾松根部,移栽入土后,表层盖上已灭菌的珍珠岩。

实验设无侵染对照和 2 种外生真菌混合侵染试验组。将苗移栽到灭菌的容器中,用 1/2 Hoagland 营养液浇灌,磷浓度处理分别为 0、5、50、500、5 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每处理 10 株,重复 4 次,培养 30 d 后采样。

1.2 马尾松紫色酸性磷酸酶基因的全长克隆

用 RNA 试剂盒 (Tiangen & Invitrogen 公司) 分别提取不同磷处理的马尾松根、茎、针叶的总 RNA,通过琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度。利用 M-MLV 反转录酶 (Tiangen 公司) 合成 cDNA 第一链,置于 -20°C 保存备用。

根据 GenBank 中野生大豆 (基因登录号: AF236108) 等高等植物 PAPs 序列中的保守区,设计简并引物克隆基因。扩增程序为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, $54 \sim 62^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 继续延伸 10 min, 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后分离、回收、纯化,连接到 PMD19-T (Takara 公司), 转化到 DH5 α (Tiangen 公司), 挑取单菌落后抽提质粒, 送生工生物工程 (上海) 公司测序, DNA 凝胶纯化回收和质粒提取试剂盒均为 OMEGA 公司。利用 NCBI 的 BLAST 工具对获得序列进行同源性比对, 确认是 PAPs 片段。

利用 SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech 公司) 克隆基因全长, 根据获得的基因片段设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异引物 (GSP1: 5'-ACCAGGGTCACGCCAGCCAACAG-3', GSP2: 5'-ACTGTTGGCTGGCGTGACCCTGG-3'), 与通用引物 UPM 进行扩增, 操作流程按照说明书, 略加改动。产物连接到 PGEM-T Easy (Promega 公司), 重组子转化到 DH5 α , 筛选 (氨苄青霉素/X-gal/IPTG)、鉴定后抽提质粒, 送生工生物工程 (上海) 公司测序。

1.3 生物信息学分析

序列检索和同源性分析由 BLAST 完成 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); 利用 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 分析基因开放阅读框 (ORF); 利用全基因组信息库 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 分析基因结构; 序列比对采用 ClustalW 和 GeneDoc 2.7, 由 MEGA5.0 生成氨基酸进化树; 预测氨基酸理化性质 ([\[expasy.org/tools/pi_tool.html\]\(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html\)\); 蛋白质亲水/疏水性分析 \(<http://web.expasy.org/protscale/>\); 膜结构预测 \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>\); 信号肽分析 \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>\); 蛋白质三级结构预测 \(<http://swissmodel.expasy.org>\), 利用 Spdbv 软件建模。](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.4 时空表达和基因表达分析

根据 ORF 序列设计特异引物 (Forward: 5'-TTCTTGGCATCAAGGCTG-3', Reverse: 5'-TGC GGTCATAAGTACGG-3'), 进行半定量和荧光定量 PCR 检测, 以不同处理的马尾松根、茎、针叶 cDNA 为模板, 选用稳定表达的 *UBQ* (*Ubiquilin*) 和 *GADPH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) 基因作为内参进行数据的标准化。分别调整 cDNA 模板浓度使内参基因表达量一致, 然后进行半定量 PCR 扩增, 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), 按说明书进行操作, 反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应程序为: 95°C 变性 3 min 后, 94°C 20 s; 60°C 退火 25 s; 72°C 延伸 20 s 共 40 次循环。检测其荧光值, 绘制溶解曲线, 重复 3 次。采用 Pfaffi 法得到各基因相对内参基因的表达量, 利用 SPSS13.0 进行方差分析, Excel 2007 作图。

1.5 酸性磷酸酶活性测定

采用硝基苯磷酸二钠 (P-Nitrophenyl phosphate, P-NPP) 法对根系的酸性磷酸酶活性进行测定: 称取不同时间低磷处理的鲜根组织 1 g, 加入 10 mL 的 HAc-NaAC 缓冲液冰浴研磨, 12 000 rpm 低温离心 20 min, 取上清液 1 mL, 加入 1 mL 底物 P-NPP 混匀, 放 37°C 水浴保温 30 min, 时而摇动。加入 1 mL 的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 充分混匀终止反应, 并使对硝基酚呈黄色, 在 405 nm 波长下测吸光度。以每分钟催化生成 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对硝基苯酚的酶量定义为一个活力单位。

2 结果与分析

2.1 马尾松 *PmPAP1* 基因结构特征

利用 RACE 法克隆获得 1 条全长 2 520 bp 的 PAPs 基因, 开放阅读框为 1 869 bp, 编码 622 个氨基酸残基, 经验证编码区序列与预期长度一致 (图 1-

A), 命名为 *PmPAP1*, 已提交 GeneBank (登录号 KT390746)。通过 NCBI 信息库检索, 氨基酸序列比对分析发现 *PmPAP1* 有紫色酸性磷酸酶保守结构域, 含 5 个保守基序和 7 个氨基酸残基 [GDMG/GDIVY/GNHE/FIAH/GHVH 下划线字体代表保守的氨基酸残基] (图 2)。*PmPAP1* 的编码蛋白包含 4 个结构域特征, MPP_PAPs 结构域属于 Metallophosphatase 超家族 (aa 296—aa 601), 是酶活性部位;

Metallophos_C 为铁/锌金属结合蛋白 (aa 536—aa 597); PLN02533 为紫色酸性磷酸酶结构域 (aa 247—aa 600); PhoD 与无机离子运输和新陈代谢相关 (aa 254—aa 355)。通过 Phytozome 植物基因组库中 *Amborella trichopoda* v1.0 基因组比对分析发现, *PmPAP1* 和无油樟 (登陆号: evm_27. TU. AmTr_v1.0_scaffold00013. 129) 具有相似的基因组结构, 含有 5 个外显子和 4 个内含子 (图 1-B)。

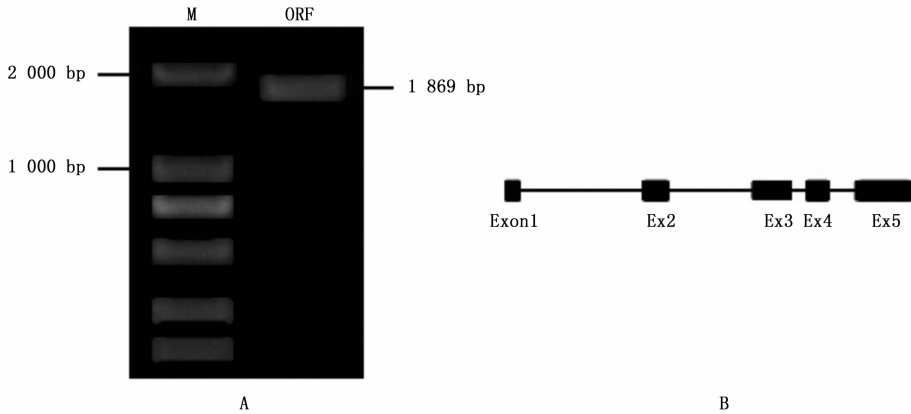


图 1 马尾松 *PmPAP1* 基因 ORF 区的克隆(A)和内含子、外显子分析(B)

2.2 同源性分析和系统进化关系

将编码蛋白与其他植物的 PAPs 进行同源比对分析, 结果显示 (图 3), 所有基因均含有 5 个保守基序、7 个氨基酸残基, 说明 *PmPAP1* 具有较高的保守性, 与莲 (登录号: XP_010258053. 1)、无油樟 (登录号: XP_006848370. 1) 的紫色酸性磷酸酶基因具有较高的同源性, 分别达到 71% 和 69%。为探明马尾松与其他植物紫色酸性磷酸酶间的进化关系, 利用邻接法将 *PmPAP1* 与可可树、野生大豆、莲等 21 个高同源性基因构建系统发育树, 根据共线性关系分为两大亚组 (图 4), 属于 I 亚组的 *PmPAP1* 与莲、无油樟的亲缘关系最近, 其次为茸毛烟草、芝麻、可可树、麻风树、马占相思以及红豆、野生大豆、鹰嘴豆、蒺藜苜蓿等豆科植物。

2.3 *PmPAP1* 的生物信息学分析

对编码蛋白分析发现, *PmPAP1* 多肽链中含有较丰富的 8.8% Ser(S)、8.4% Gly(G)、6.6% Leu(L) 氨基酸, 带负电荷的氨基酸残基 (Asp + Glu) 总个数为 66, 带正电荷的氨基酸残基 (Arg + Lys) 总个数为 50, 消光系数为 146 680, 蛋白质不稳定指数侵染 0 d、6 d、12 d、16 d、24 d、30 d, 不同部位 (根、茎、叶) 的荧光定量相对表达量。由图 6 可知, 不同处理时间, 同一部位中 *PmPAP1* 表达量不同; 相同处

为 38.33, 推测 *PmPAP1* 属于稳定蛋白质。其理论等电点 (PI) 为 5.63, 分子量为 70.21 kDa。利用 SWISS-MODEL 数据库预测 *PmPAP1* 三维结构 (图 5-A), 以 Swiss-Model 上编号为 3zk4.1.A 的模型作为模板, 其与 *PmPAP1* 蛋白的相似度为 71.48%, 从第 51~622 位氨基酸上有较高相似性, 含有 Fe^{3+} 的双金属离子。分析 5 个保守基序结构域发现, *PmPAP1* 在位于 β - α - β - α - β 折叠中 β 链上的羧基末端, 存在由氨基酸残基与金属离子中心环绕构成的活性部位。跨膜结构分析发现 (图 5-B), *PmPAP1* 无明显跨膜区, 说明不是膜蛋白或不定位在膜上。基于 Kyte-Doolittle 算法的亲水性图谱可知 (图 5-C), *PmPAP1* 的亲水性氨基酸残基多于疏水性氨基酸残基, 疏水区域最高值 (Score = 3.967) 出现在第 18 个氨基酸残基, 亲水区域的最高值 (Score = -2.767) 出现在第 381 个氨基酸残基, 推测 *PmPAP1* 具有亲水性。由图 5-D 可知, 在第 30~31 个氨基酸之间有信号肽输出, 可能是分泌或运输蛋白。

2.4 接种 ECM 后 *PmPAP1* 的时空表达特征

测定低磷胁迫下马尾松在不同处理时间 (菌根理时间, 不同的部位其表达量也不同。根、茎、叶中 *PmPAP1* 的表达受到外生菌根的诱导, 其表达量都显著高于不接种对照。接种 ECM 的根中 *PmPAP1*

```

ccgaccgacctgtacctatgccactcgtgctgttgactctgctactggagattatgggtgactagatctcttttctctgctcctcgc : 90
cctgtgatttcccccctcttcttccatgcgcttttgaaacctgcctaacgacgtgaagtctctctctatggcgacagcgacgt : 180
tttgctggcaggtcgcaagtccaagtcaggggatagcaaaagctaggagcacttctcaagcagaacaacatatacagcgatgcatctt : 270
ctgacaataaagattctgaaattgattcatagatccattcggagttggaaggcaagggaagctgtaggagatgggagaagtaagaatg : 360
                                     M G E S K N
taatggggcagattggcactcttattatagtgatcttactttctcaacttcgcaaaagttggagcttcagatcagcctctttcca : 450
V M G Q I W Q L L I I V I L L F S T S P K V G A S D Q P L S
aaattgaaattcagaagactactgttctcttcacagttctgctcattgaagtcactccaatctcttggcatcaagggtgaacag : 540
K I E I Q K T T V A L H S S A H I E V T P N L L G I K G E T
ttgagtggtgactgtaaaatcaaccaccttctccatcagaagaatgattggattggagttttctccagcaaaaatcaatggctctg : 630
V E W V T V K F N H L S P S E S D W I G V F S P A K F N G S
tatgttcaccagaagtgaccagagagatcaggttccgtacttatgcaccgcaccaataaagttccaatgcaaaattttcagcac : 720
V C S P E S G P E R D Q V P Y L C T A P I K F Q A A N F S A
acaactatgttcggatagaaatgcatcttgaagctcaattgatcaatcagcgggctgactttgctttgacattttacgggtggac : 810
H N Y V R I G N G S L K L Q L I N Q R A D F A F A L F T G G
tttctaactctgtgtttggcacttcaaaactgtagatttggatccaagctccagttatccacgcatgctcaggggaaat : 900
L S N P V L L A I S N T V R F V D P K S P V Y P R I A Q G K
cttgggatgaaatggtgttacatggcaagtggttatggcattgaggaagcagacactattgttcagttggctcccaaggagaggagt : 990
S W D E M V V T W T S G Y G I E E A T P I V Q W G P Q G E E
caaaaattttgcccagctgggacgttgacattcggctgtaacagcatgtgtggcgacctgctgactgttggctggcgtagccctg : 1080
S K F L S P A G T L T F G R N S M C G A P A R T V G W R D P
gtttatacacacagattttctacatgacttatggccaacatgaaatatttacagagttggctatagcgtattcaacgggttcatatg : 1170
G F I H T S F L H D L W P N M K Y Y Y R V G H R L F N G S Y
ctcgggaaaagtaaaattttatcatcattccatcctcctggaagattctcacaactgtgattattttggggacatggggaag : 1260
V W G K V N L F T S S P Y P G Q D S L Q R V I I F G D M G K
cagaacgtgatgggtctaatgataataaactccagcccgggtcttcaactactgataggctagttgaggaactggagaatattg : 1350
A E R D G S N E Y N N F Q P G S L N T T D R L V E D L E N I
acatagttttccatattggagacattgtttatgcaaatggatcacatctcctcaatgggatcaattacatcacaatagagcctattgctt : 1440
D I V F H I G D I V Y A N G Y I S Q W D Q F T S Q I E P I A
cacatgtcttcacatgatagccagtggaaccatgaacgtgattggccaataacaggttcttctataagaacctgattcaggtggag : 1530
S H V P Y M I A S G N H E R D W P N T G S F Y K N L D S G G
aatgtggttcccagctcgaacactgtttatgtgctcacaataaacagggaagtttggctactcaccagactgatgcttccatt : 1620
E C G V P A Q T M F Y V P T N N R D K F W Y S T D Y G M F H
tctgtattgctgattcagaacatgattggcagaggggaacagagcaatacaagttccatcagggaatgttttgatcctccgatagacaga : 1710
F C I A D S E H D W R E G T E Q Y K F I E E C F A S A D R Q
agcagcctgcttatttttctcactcgtgttcttaggctactcctcagcctcctggtatgcagaggaggagcatttgaagacct : 1800
K Q P W L I F I A H R V L G Y S S A S W Y A E E G A F E P
tgggagagagatgctgcaaaagctcggcagaagataaaagtgaccctttttagccatttcacaattatgacgcaaatgct : 1890
M G R E M L Q K L W Q K Y K V D L A F Y G H V H N Y E R T C
ccatttatgagacatagtgtgagttctgaaagctcactattctggtacgttcaatcaaccatacacgtagtggttggtggggag : 1980
P I Y E N I C V S S E R S H Y S G T F N A T I H V V V G G G
gttgccctagctgattatactactctacaaccagttggagttatttcaaggaccatgattatggatttggtaagctcagcggcttta : 2070
G C A L A D Y T T L Q T S W S Y F K D H D Y G F V K L T A F
atcattctcttctgctcagtacaagaaaagttcagatgggaaagtttatgatcagtttggataacaagagatcagaggatattc : 2160
N H S S L L L E Y K K S S D G K V Y D Q F W I T R E Y R D I
tcggatgtgataccattggcaactgccctctactaccttagcttcataaattgggatactcataataataaaaataaaagaatat : 2250
L G C D T I G N C P S T T L A S *
tatgccctggggtattttggacattcgttccacacttattgtgatttggtagaagatgggttcagttcttggacttcaactgtca : 2340
aagttatattggttcccatatgaagattacaaggtcctactatgttcaagattttctgctcctctgctcaagttggttacattaaatt : 2430
attcattcattccctctctatgtaataaaaatgcaattcctatgtcaaatgtaagcaattcttatgttcaatttgggtgaataga : 2520

```

矩形框所示为 *PmPAP1* 的 5 个保守基序 [G DMG/G DIV Y/G NHE/FIA H/G HV H], 其中 7 个保守氨基酸残基用浅灰色背景标记

图 2 *PmPAP1* 的 cDNA 全长序列和编码氨基酸

表达量最高, 次为茎和叶, 并随着侵染时间的延长呈上升趋势, 其中从侵染最初到第 18 天, 根系中增幅最明显, 随后呈波浪式变化。而未接种对照中, 针叶里表达量要高于根、茎, 其变化趋势呈曲线波动但幅度不大。

2.5 不同磷浓度下 *PmPAP1* 的表达分析

为了解马尾松 *PmPAP1* 在不同组织, 不同磷浓度中的表达情况, 利用半定量和荧光定量 PCR 分析

基因相对表达量。半定量结果显示(图 5-A), 不同磷条件下未接种 ECM 的马尾松中, *PmPAP1* 在针叶中表达量高于根、茎, 接种 ECM 后, 其根、茎中表达量大幅上调, 且在 0 ~ 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 低磷条件下 *PmPAP1* 表达均明显增强, 而在 5 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高磷条件下表达量出现下调。荧光定量表达(图 5-B)与半定量变化趋势比较一致, 接种 ECM 后植株不同部位的 *PmPAP1* 表达量显著不同, 根 > 叶 > 茎,

蒺藜苜蓿:	-----MEWVRI LMFCLIVSFWDSMNALHQEQPLSKIAIHNTVLALDINAAYIKASPDILIGABGKNNWVNLISFGNPNPSGDDVWGVFSPSNFNNGSTCAPENN-	41
无油樟:	MRAEGLFMNMVAVWMLNFINVFCFAHIGFGDQPLSKIAIHKAVVLSHSAASITATPSLLGTGKEDTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKLNSSTCFVSD-	98
红豆:	MGNHPELSENFMI LLLFL LLLSFA SPHINGFGQPLSKISLHKT VVLSHNASLRASPSLLGKIGEDTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKFNASSTCFVSD-	106
马占相思:	-----MIWVWV LLLAANLNLGWAHINGAGEHPLAKINILKATLALHNSATVKAQFVLLGLKIGEDTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKFNASSTCFVSD-	97
可可树:	-----MGE SKNVWGIQ LLLI VLLFL STS PKVAGSDQPLSKIEIQT TVALHS SAHIVT ENLLGIKIGEDTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKFNASSTCFVSD-	104
PmPAP1:	-----MERHLSKLL LLLV LLLSNGVAASHRVVDEQEQPLSKIAIHKATLALDLSASVKAYFVFLGLKIGEDTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKFNASSTCFVSD-	103
野生大豆:	-----DTQWTVVDIYDPSADDVWGVFSPAKFNASSTCFVSD-	38
蒺藜苜蓿:	PKEQIPFICSAPIKYKFSNYNSRYT KTGKASLRFQLINQRADF SFALF SGGT SNPKLVAVSNFISFANPKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	148
无油樟:	-RDGPPICTAPIKYQANFSPSYTTNGTLLSLLINQRADF SFALF SGGFVQPKLIVASNIFSLY PKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	204
红豆:	PKBBIPIYCSAPIKFKFLNYNSHYT KTGKSLRFQLINQRADF SFALF SGGLLM PKLVAVSNFISFVNPKVPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	213
马占相思:	PKBQTPTCSAPVYKFNVTNPNYTKTGKSLRFQLINQRADF SFALF SGGLSNPKLVAVSNFISFANPKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	213
可可树:	PKBQLPYCSAPIKYKYANSSSYTKTGKSLRFQLINQRADF SFALF SGGLSNPKLVAVSNFISFANPKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	204
PmPAP1:	ERDQVPLCTAPIKQYANFSAHNVIRI GNSLKLQLINQRADF AFALE TGGLSNPKLVAVSNFISFANPKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	211
野生大豆:	SRVRAPEFCSAPIKYQYANSSPNYTKTGKSLRFQLINQRADF SFVLE SGGLSNPKLVAVSNFISFANPKAPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	210
野生大豆:	PKVEIPYCSAPIKFKMNYNSYTKTGKASLRFQLINQRADF SFALF SGGLLM PKLVAVSNFISFVNPKVPLYPRLAQGKSWDEMTVTWTSYGYDIKEATPFVWBG	145
蒺藜苜蓿:	PQGG-TPVQS PAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	254
无油樟:	LKGD-SQIRSPAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	310
红豆:	SEGG-TQVQSPAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	319
马占相思:	LKGE-SLRS PAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	319
可可树:	RKGN-LQLRSPAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	310
PmPAP1:	PQGBESKLS PAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLHDLWPNMKYRYVGHRLFNGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	318
野生大豆:	LKGE-PQMS PAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLRDLWPNMKYRYVGHRLFNGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	316
野生大豆:	PKKG-TQVQSPAGTLTFGRNSMCGSPARTVGRDPGFIHTSFLKNLWPNLVYAYRLGHLLPDGSIYWSKYSFKSSPYPGQDSLQORVIF	251
蒺藜苜蓿:	QPGLSNTDRDLIEDLKNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	361
无油樟:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	417
红豆:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	426
马占相思:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	426
可可树:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	417
PmPAP1:	QPGLSNTDRLVEDLKNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	425
野生大豆:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	423
野生大豆:	QPGLSNTDQLIKDLNIDIVFHGIDITYANGYSIQWQDPTAQVEPIASTVYPMIASGNHERDWPNTGSFYDNTDSGGECCVLAETMFYVPAENRAKFWYATDYGMF	358
蒺藜苜蓿:	RFCIADTEHWDREBEGSEQYKIEBHCLATVDRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	468
无油樟:	HFCIADTEHWDREBEGSEQYKIEBHCLASADRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	524
红豆:	HFCIADSEHWDREBEGSEQYKIEBHCLATVDRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	533
马占相思:	RFCIADTEHWDREBEGSEQYKIEBHCLATVDRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	533
可可树:	HFCIADSEHWDREBEGSEQYKIEBHCLASADRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	524
PmPAP1:	HFCIADSEHWDREBEGSEQYKIEBHCLASADRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	532
野生大豆:	HFCIADSEHWDREBEGSEQYKIEBHCLASADRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	530
野生大豆:	RFCIADTEHWDREBEGSEQYKIEBHCLATVDRQKQPWLLFAAHRVLGYSSDFWYGMGFSFABPMGRESLQRLWQKYKVDIAFY	465
蒺藜苜蓿:	GIVNGTIHVVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEATTLAS	557
无油樟:	GIVNGTIHVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEATTLAS	613
红豆:	GVNGTIHVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEATTSVT	622
马占相思:	GTVNGTIHVVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEPTLAD	622
可可树:	GVNGTIHVVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEATTLAS	613
PmPAP1:	GTNATIIHVVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEPTLAD	622
野生大豆:	GVNGTIHVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEPTLAD	619
野生大豆:	GVNGTIHVVAGGSHLSNF SQT PWSLYR DYDFGEVKLTA FNHNSLLFEYKKS SDGNVYDSFTISRDYKDV LACVHDS-CEATTSAT	554

蒺藜苜蓿 (XP_003608832), 无油樟 (XP_006848370), 红豆 (KOM32693), 马占相思 (BA045898), 可可树 (XP_007037978), 荷花 (XP_010248988), 野生大豆 (KHN34417)

图 3 PmPAP1 与其他植物紫色酸性磷酸酶序列同源比对分析

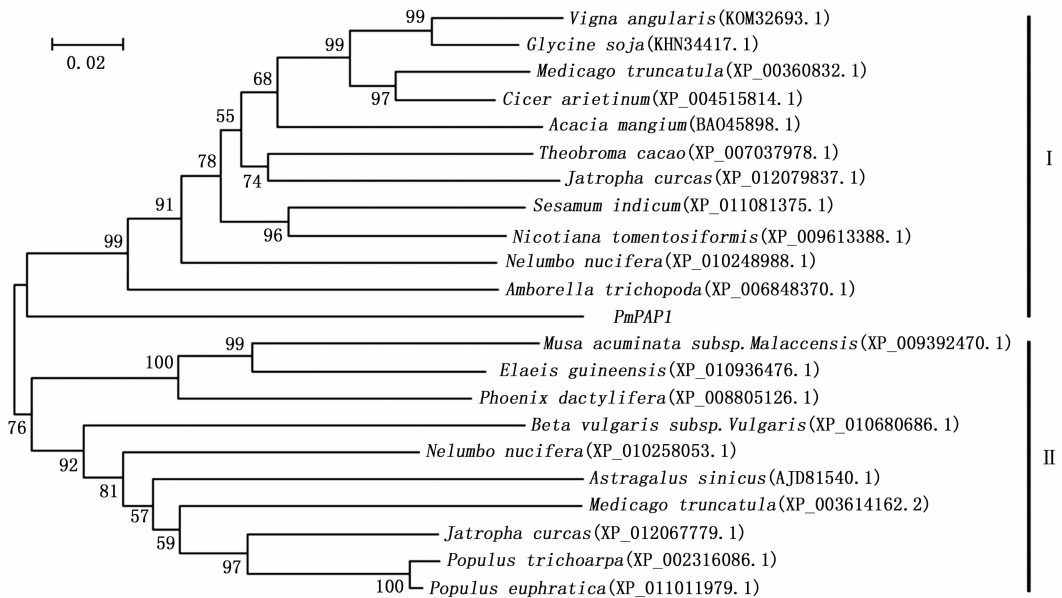
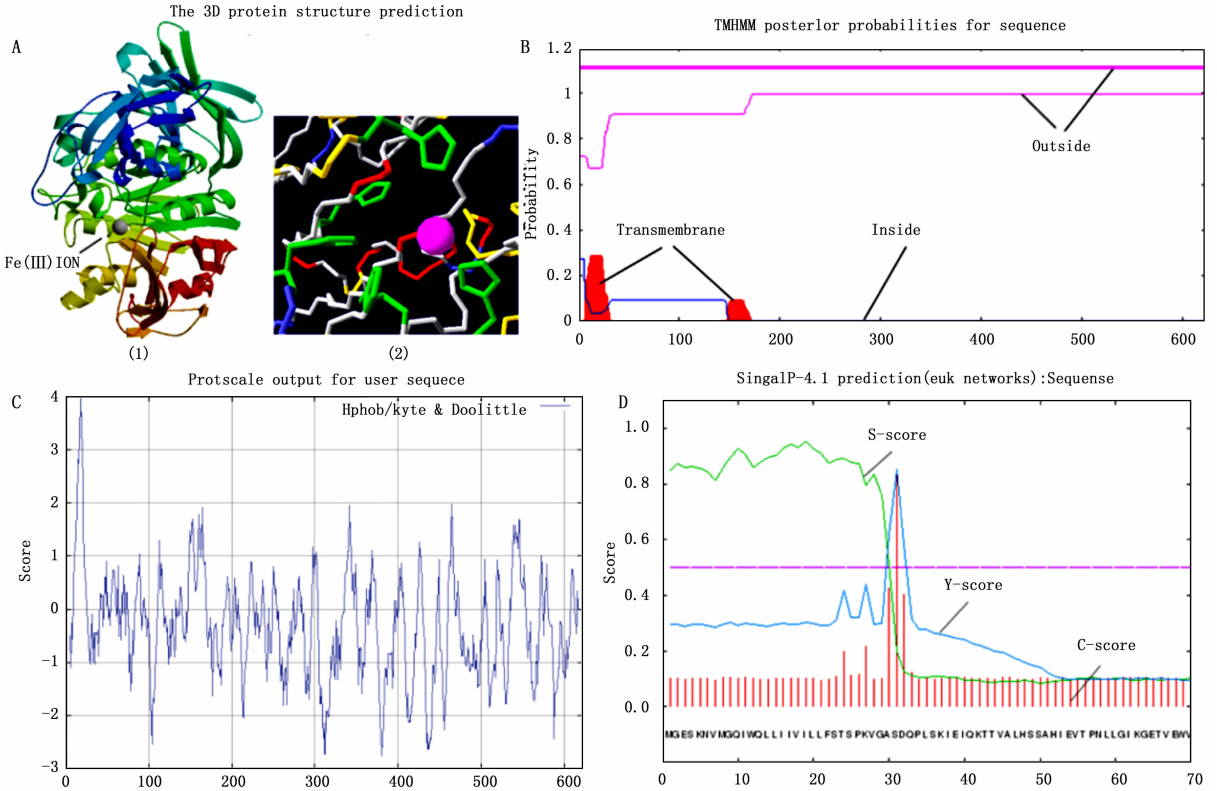
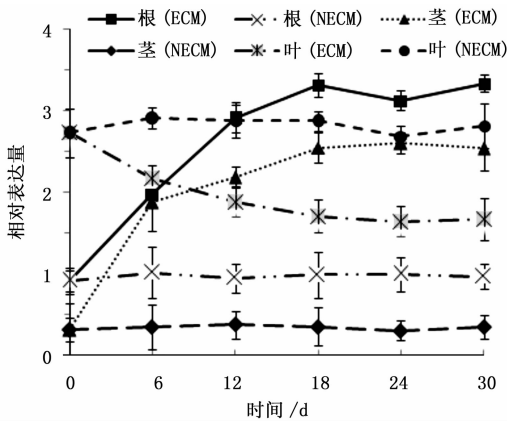


图 4 基于紫色酸性磷酸酶基因氨基酸序列的系统发育树



A: 三维结构预测图(A-2 粉球区为金属离子中心,绿色折叠区为5个保守基序); B: 跨膜域分析图; C: 亲、疏水性分析图; D: 信号肽分析图

图5 *PmPAP1* 结构分析和功能预测



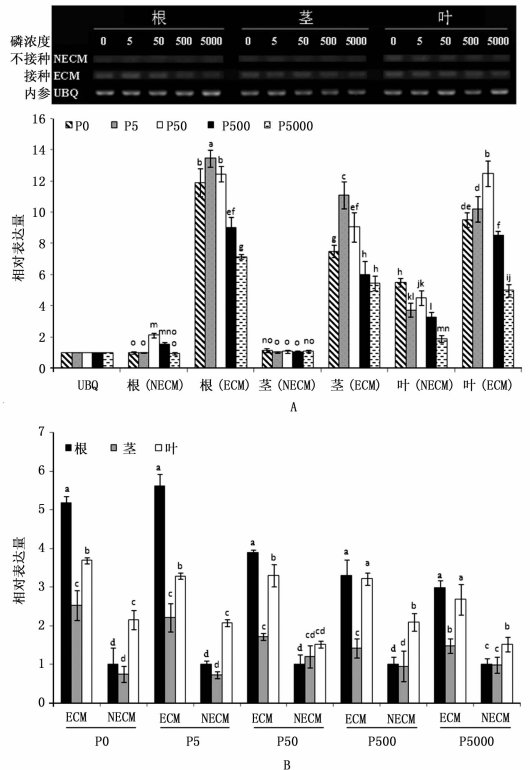
NECM: 不接种菌根, ECM: 接种外生菌根

图6 *PmPAP1* 在 ECM 处理下时空表达特征

特别是低磷胁迫下基因表达更为活跃,如 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷浓度下马尾松根中 *PmPAP1* 表达量达到显著性水平 ($p < 0.05$), 是不接种对照的 5.6 倍。

2.6 根系酸性磷酸酶活性分析

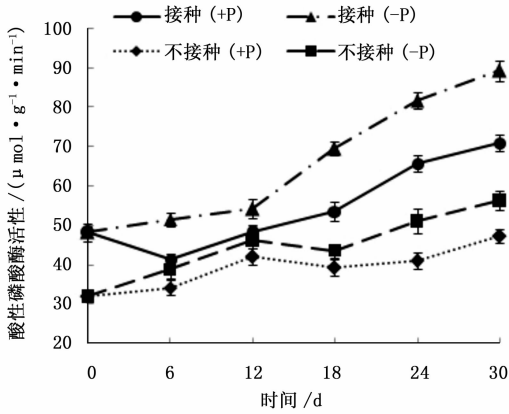
接种 ECM 的马尾松和无侵染对照进行低磷胁迫,分别测定其第 0 d、6 d、12 d、18 d、24 d、30 d 根系中酸性磷酸酶活性(图 8)。结果表明,在低磷和正常磷供给处理中,随着时间的延长根系酸性磷酸酶活性不断增强,低磷处理组比正常供磷组上升快,且



NECM: 不接种菌根; ECM: 接种外生菌根, 相同磷供给下的不同字母表示差异显著性 ($p < 0.05$)

图7 不同磷水平下 *PmPAP1* 表达的半定量(A)和荧光定量(B)分析

接种 ECM 的马尾松根系中其活性比不接种对照高,在第 30 d 分别达到 1.89 和 1.5 倍,说明酸性磷酸酶活性与磷水平和胁迫时间有相关性。所有根系中酶活性变化都呈高低交替趋势,这可能与马尾松生长发育相关。



+ P: 正常供磷; - P: 磷浓度 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图8 低磷胁迫下根系酸性磷酸酶活性测定

3 讨论

植物紫色酸性磷酸酶按分子量大小分为高分子量 PAPs (HMW PAP) 与低分子量 PAPs (LMW PAP) 两类^[2, 18],前者如 55 kD 左右的大豆 PAP^[19];而 32 kD 的水稻 OsPAP3 则为 LMW PAP^[20]。HMW PAP 包含 2 个结构域:无催化功能的 -NH 端和具催化功能的 -COOH 端,其有 $\text{Fe}^{3+} - \text{Me}^{2+}$ 双金属离子核心区域,且 Me^{2+} 金属核为 Zn^{2+} 或 Mn^{2+} ^[2, 21-22]。马尾松 *PmPAP1* 分子量为 70 kD,其双核金属结合点为 $\text{Fe}^{3+} - \text{Zn}^{2+}$,与 HMW PAP 的结构特征一致^[23-24],是典型的高分子量 PAPs。根据紫色酸性磷酸酶是否能分泌到细胞外的特性,划分为分泌型 PAPs (SAP) 和细胞内 PAPs (IAP)^[25-26],分泌型酸性磷酸酶可被分泌出细胞外活化土壤有机磷组分,释放出供植物利用的无机磷,包括拟南芥的 AtPAP10 和 AtPAP12^[27-28],菜豆的 PvPAP1 和 PvPAP3^[29],以及水稻的 OsPAP10^[30]等,而细胞内酸性磷酸酶主要进行胞内磷素的再利用,特别是植物处于低磷环境时,体内的 IAP 会降解磷库,如单核苷酸、磷脂等,释放无机磷供植物的正常生长^[26, 31]。*PmPAP1* 有信号肽输出,但不进行跨膜运动,定位在细胞质基质或细胞器基质中,属于 IAP,与植物体内磷素的活化利用相关。

PmPAP1 与其他植物 PAPs 匹配率在 67% ~ 72%,氨基酸具有差异性。作为裸子植物的马尾松

PmPAP1 与莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)、无油樟 (*Amborella triecopoda* Baill.) 的同源性最高、亲缘关系最近,按 APG III 分类法将无油樟目、睡莲目列为被子植物的基底旁系群,莲是最古老的双子叶植物之一,作为孑遗植物的无油樟则是已知植物中最早与其它被子植物分开演化的类群,说明其进化关系古老,且变异性不大、保守性强。

外生菌根是真菌和植物根系间的共生体系,其菌丝可包裹于幼根表面,或穿入细胞皮层的间隙,扩大根系与土壤的接触面。这些菌丝体和根状菌索作为寄主植物与真菌的溶质交换界面,一边给植物输送水和营养,同时也从寄主根系中获取碳水化合物^[32]。*PmPAP1* 的表达与外生真菌的侵染有密切关系,在接种 ECM 的马尾松根、茎、叶中都有表达,与对照相比呈上调趋势,且根系表达的提升量最大,使植株活化利用吸收进体内磷素的能力提高,因此外生菌根促进马尾松植株生长的重要原因之一是提高了 *PmPAP1* 的表达。

研究发现,在大豆^[6, 33]、拟南芥^[34]、水稻^[20, 35]、玉米^[36]等植物不同组织中 PAPs 基因均被低磷诱导表达。马尾松 *PmPAP1* 同样证明了磷饥饿与紫色酸性磷酸酶的表达有重要相关性,也参与了菌根化马尾松对低磷胁迫的应答,且根系比茎和针叶对低磷的响应更加显著,因此 *PmPAP1* 在根系中更为活跃,可能参与了磷素的转运过程,在维持马尾松体内磷素动态平衡中发挥作用。有研究表明,水稻 OsPAP10a 的表达受低磷胁迫诱导,且该基因的过量表达能引起根和叶中酸性磷酸酶活性的增强,并提高体内 ATP 的分解与利用^[19, 37]。

4 结论

本研究中,菌根化马尾松幼苗在低磷胁迫一个月,其根系 *PmPAP1* 的表达量随胁迫时间的延长而上调表达,与此同时酸性磷酸酶的活性也持续增高,二者的变化趋势一致。因此,*PmPAP1* 在调控马尾松植株磷素周转和再度利用中发挥了重要作用,为进一步研究马尾松 PAPs 家族功能和探索其低磷响应机制提供了新信息。

参考文献:

- [1] Klabunde T, Sträter N, Krebs B, et al. Structural relationship between the mammalian Fe (III)-Fe (II) and the Fe (III)-Zn (II) plant purple acid phosphatases[J]. Febs Letters, 1995, 367(1): 56-60.

- [2] Schenk G, Guddat L W, Ge Y, *et al.* Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants[J]. *Gene*, 2000, 250(1): 117–125.
- [3] Cashikar A G, Kumaresan R, Rao N M. Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase[J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(3): 907–915.
- [4] Oddie G W, Schenk G, Angel N Z, *et al.* Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase[J]. *Bone*, 2000, 27(5): 575–584.
- [5] Yoneyama T, Taira M, Suzuki T, *et al.* Expression and characterization of a recombinant unique acid phosphatase from kidney bean hypocotyl exhibiting chloroperoxidase activity in the yeast *pichia pastoris*[J]. *Protein expression and purification*, 2007, 53(1): 31–39.
- [6] Carla E. Hegeman, Elizabeth A. Grabau. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1598–1608.
- [7] Li C, Gui S, Yang T, *et al.* Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis[J]. *Annals of botany*, 2012, 109(1): 275–285.
- [8] Kaida R, Hayashi T, Kaneko T S. Purple acid phosphatase in the walls of tobacco cells[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(14): 2546–2551.
- [9] Zimmermann P, Regierer B, Kossmann J, *et al.* Differential expression of three purple acid phosphatases from potato[J]. *Plant Biology*, 2004, 6(5): 519–528.
- [10] Bozzo G G, Raghobama K G, Plaxton W C. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures[J]. *Biochem*, 2004, 377: 419–428.
- [11] Liao H, Wong FL, Phang TH, *et al.* GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency[J]. *Gene*, 2003, 318: 103–111.
- [12] Zhu H, Qian W, Lu X, *et al.* Expression patterns of purple acid phosphatase genes in Arabidopsis organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower[J]. *Plant molecular biology*, 2005, 59(4): 581–594.
- [13] Kaida R, Sage-Ono K, Kamada H, *et al.* Isolation and characterization of four cell wall purple acid phosphatase genes from tobacco cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625: 134–140.
- [14] Kaida R, Satoh Y, Bulone V, *et al.* Activation of β -glucan synthases by wall-bound purple acid phosphatase in tobacco cells[J]. *Plant physiology*, 2009, 150(4): 1822–1830.
- [15] Kaida R, Serada S, Norioka N, *et al.* Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells[J]. *Plant physiology*, 2010, 153(2): 603–610.
- [16] 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, 2(32): 85–88.
- [17] 周志春, 谢钰容, 金国庆, 等. 马尾松种源对磷肥的遗传反应及根际土壤营养差异[J]. *林业科学*, 2003, 39(6): 62–67.
- [18] Olczak M, Morawiecka B, Watorek W. Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function[J]. *Acta biochimica polonica*, 2003, 50(4): 1245–1256.
- [19] Beck J L, McConachie L A, Summors A C, *et al.* Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1986, 869(1): 61–68.
- [20] Zhang Q, Wang C, Tian J, *et al.* Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling[J]. *Plant Biology*, 2011, 13(1): 7–15.
- [21] Klabunde T, Sträter N, Fröhlich R, *et al.* Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures[J]. *Journal of molecular biology*, 1996, 259(4): 737–748.
- [22] Mertz P, Yu L, Sikkink R, *et al.* Kinetic and spectroscopic analyses of mutants of a conserved histidine in the metallophosphatases calcineurin and λ protein phosphatase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(34): 21296–21302.
- [23] Klabunde T, Krebse B. The dimetal center in purple acid phosphatases, metal sites in proteins and models[J]. *Springer Berlin Heidelberg*, 1997, 89: 177–198.
- [24] Schenk G, Carrington L E, Hamilton S E, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction data for a purple acid phosphatase from sweet potato[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1999, 55(12): 2051–2052.
- [25] Wasaki J, Yamamura T, Shinano T, *et al.* Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency[J]. *Plant and Soil*, 2003, 248(1–2): 129–136.
- [26] Veneklaas E J, Lambers H, Bragg J, *et al.* Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants[J]. *New Phytologist*, 2012, 195(2): 306–320.
- [27] Wang L, Li Z, Qian W, *et al.* The Arabidopsis purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157: 1283–99.
- [28] Robinson WD, Park J, Tran HT, *et al.* The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and tPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by Arabidopsis thaliana[J]. *Exp Bot*, 2012, 63(18): 6531–6542.
- [29] Liang C, Sun L, Yao Z, *et al.* Comparative analysis of PvPAP gene family and their functions in response to phosphorus deficiency in common bean[J]. *Plos one*, 2012, 7(5): e38106–e38106.
- [30] Dai X, Wang Y, Yang A, *et al.* OsMYB2P-1, an R2R3MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice[J]. *Plant Physiol*, 2012, 159: 169–83.
- [31] Erik J. Veneklaas, Hans Lambers, Jason Bragg, *et al.* Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants[J]. *New Phytol*, 2012, 195: 306–320.
- [32] Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Microbiol*, 2005, 59: 19–42.
- [33] Wang X, Wang Y, Tian J, *et al.* Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean[J]. *Plant Physiol*, 2009,

151; 233–240.

- [34] Li, D., Zhu, H., Liu, K., *et al.* Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*: comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation [J]. *Biol. Chem.*, 2002, 277: 27772–27781.
- [35] Yan K, Wang C Q, Li H X. Effects of phosphorus level on the activity of acid phosphatase in roots of hybrid rice and its parents [J]. *Chinese Journal of Rice Sciences*, 2010, 24(1): 43–48.
- [36] 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.
- [37] Tian J, Wang C, Zhang Q, *et al.* Over expression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(9): 631–639.

(责任编辑:张 研)