

拟南芥液泡膜水通道蛋白TIP2参与低磷胁迫信号通路的初步研究

李显煌¹, 徐亚楠¹, 朱春风¹, 赵晨光², 康君^{1,*}

¹天津大学生命科学学院, 天津300072

²清华大学生物医学测试中心, 北京 100084

摘要: 磷是植物生命活动所必需的大量元素之一。在缺磷环境中生长时, 植物会产生一系列的适应性应答反应。本研究筛选到一个对低磷胁迫超敏的拟南芥突变体*hps20* (*hypersensitive to Pi starvation 20*)。低磷条件下, 与野生型相比, *hps20*突变体根表面分泌了过量的酸性磷酸酶; 花青素积累增多; 部分低磷诱导基因上调表达。分子鉴定表明, *hps20*突变体的表型是由TIP2 (*Gamma Tonoplast Intrinsic Protein 2*)基因的缺失引起的。无论环境是否缺磷, *hps20*突变体的叶中无机磷含量较野生型低, 而根中磷含量较野生型高, 与*pho1*突变体表型类似, 表明TIP2基因可能通过调控Pi在植物体内的转运, 参与到Pi信号转导过程。

关键词: 低磷胁迫; 拟南芥; *hps20*突变体; TIP2基因; Pi转运

磷(P)在植物生长和发育中起着关键作用, 通常以无机磷(磷酸氢根或磷酸二氢根, Pi)的形式被植物吸收。然而, 在大多数土壤中, 无机磷酸盐(Pi)的浓度远低于植物生长所需的最适水平(Raghothama 2000)。为了适应生长环境中Pi含量的缺乏, 植物已经进化出复杂的适应性响应机制以增强Pi的获取和利用效率。这些反应包括根构型重塑、根表面Pi转运蛋白活性的增强、酸性磷酸酶(acid phosphatase enzyme, APase)和核糖核酸酶的诱导和分泌, 以及淀粉和花青素的积累(Yuan和Liu 2010)。

在过去几年中, 已经鉴定了几种重要低磷胁迫响应的信号传导组分。PHR1蛋白是参与低Pi胁迫响应的第一个信号组分, 是多种低Pi胁迫响应的正调节因子(Rubio等2001)。PHO1基因编码一个N端亲水、C端含有6个跨膜结构域蛋白(Hamberger等2002)。与野生型相比, *pho1*突变体叶中Pi含量低并且表现出缺Pi症状; 这些表型是由于其不能将Pi运输到木质部引起的(Poirier等1991)。*pho2*突变体与野生型植物相比, 在Pi充足和缺乏条件下在叶中Pi含量较高, 根中Pi含量正常(Delhaize和Randall 1995)。由于一些Pi转运蛋白的上调, 使它具有较强的Pi摄取能力。进一步发现, PHO2基因对应UBC24基因其编码一个泛素E2结合酶, 与*microRNA399* (*miR399*)和PHR1基因一起构成了低磷胁迫响应的信号传导途径(Bari等2006)。*miR399*是一组小的非编码RNA, 在拟南芥基因组

中有6个成员, 命名为*miR399a~f*。它们都可与UBC24基因5' UTR中的靶序列结合。低Pi胁迫可以快速可逆地诱导*miR399*的转录, 且PHR1基因是这种诱导所必需的。在*miR399*过表达株系中, UBC24基因转录物减少, 植物显示出与*pho2*突变体相似的表型。UBC24和*miR399*转录物共定位于维管柱中, 表明这两种基因表达的协调作用。*miR399*可以从叶片运输到根, 并作为信使传递叶片中Pi的状态到根, 从而调节Pi的吸收和转运, 最后维持植物的Pi稳态(Lin等2008)。

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是细胞膜上介导水分渗透调节的一类通道蛋白, 对植物应对各类非生物胁迫的过程中具有非常重要的作用(Aroca和Ruiz-Lozano 2012)。水和小的中性溶质(尿素、硼酸、硅酸等)以及气体(氨、二氧化碳)的跨膜运输主要是通过水通道蛋白完成的(Maurel等2008)。研究发现一些蛋白可与水通道蛋白相互作用, 从而调控其功能。AQP0四聚体可与2个钙调蛋白以Ca²⁺依赖的方式结合, 调控通道活性(Richow和Gonen 2008)。液泡膜内在水通道蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)是一类液泡膜定位的水通道蛋白, 是水通道蛋白亚家族成员(Wudick等2010)。TIP2基因属于拟南芥液泡膜水通道蛋白亚家族, 拟南芥TIPs对侧根的早期生长发育起着重

收稿 2019-02-19 修定 2019-09-25

资助 天津市自然科学基金青年项目(16JCQNJC09800)。

* 通讯作者(jun.kang@tju.edu.cn)。

要作用, *TIP2* 基因的表达式与侧根原基的生长紧密相关(Reinhardt等2016)。拟南芥中 *TIP1* 基因敲除突变体与野生型的表型无明显差异, *TIP1* 基因和 *TIP2* 基因的双突变体显示花青素含量增加, 过氧化氢酶活性降低(Schussler等2010)。这些研究表明 *TIP2* 基因可能存在其他功能未被发现。

本研究中, 我们通过在低磷条件下筛选拟南芥T-DNA插入突变体库, 得到了主根生长较野生型受到更强抑制的突变体 *hps20*。首先检测了 *hps20* 突变体根表面的酸性磷酸酶(APase)活性, 随后定量测量了无机磷、总磷和花青素含量, 又对 *hps20* 突变体体内低磷响应基因的表达进行了实时定量PCR检测, 最后运用RT-PCR法对回交多代的 *hps20* 突变体的突变基因进行了验证, 进而初步揭示了 *HPS20* 基因参与低磷信号转导的模式。

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长条件

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型和 *hps20* (*hypersensitive to Pi starvation 20*)突变体均为Colombia生态型。正常培养基(P+)是具有10 g·L⁻¹蔗糖和11 g·L⁻¹琼脂(Sigma, A1296)的1/2MS培养基。通过用0.625 mmol·L⁻¹ K₂SO₄替换P+培养基中的0.625 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄来制备低磷培养基(P-)。将种子用20%漂白剂表面灭菌15 min, 在无菌蒸馏水中洗涤4次后, 将种子播种在含P+或P-培养基的培养皿上。放入4°C冰箱春化2 d, 然后移入光照培养箱, 长日照条件培养(16 h光照, 8 h黑暗, 22~24°C)。

1.2 实验方法

1.2.1 突变体筛选

筛选用的T-DNA插入突变体种子订购于拟南芥生物资源中心(Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC)。每个P-培养基铺2行种子, 每行铺4~6粒野生型(WT)种子作对照。低温处理2~3 d后, 放入23°C温室竖直培养8 d, 挑选根发育极短且子叶发育较为正常的苗, 移入土中培养。待植物结籽后, 进行表型重复。确定表型的突变体方可进行接下来的实验。经过筛选, 获得 *hps20* 突变体, 用于本研究。

1.2.2 酸性磷酸酶(APase)活性检测

拟南芥幼苗根表面APase组织化学染色, 将含有0.1 g·L⁻¹ BCIP的5 g·L⁻¹琼脂溶液均匀覆盖在琼脂平板上生长的苗根部。染色12 h后, 用连接到立体显微镜(Olympus SZ61)的照相机拍摄。

将培养8 d的WT和 *hps20* 突变体的根叶分开提取总蛋白, 分别取10 μg叶蛋白和5 μg根蛋白与对硝基苯磷酸二钠(p-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, pNPP)反应液温育1 h, 将反应产物测A₄₁₀。同时, 取等量蛋白上样进行SDS-PAGE电泳, 用预冷的双蒸水洗6遍复性后, 用pNPP检测植物组织内APase活性。

1.2.3 花青素含量测定

正常温度和光照培养条件下, *hps20* 突变体和野生型在正常和低磷培养基上培养12 d取样。向预先称重的新鲜叶片中加入1 mL花青素提取液(18%丙醇、1% HCl), 常温避光过夜萃取, 12 000×g离心5 min, 吸取上清, 用分光光度计测量530 nm和650 nm波长处的光吸收值; 花青素含量计算公式为(A₅₃₀-A₆₅₀)·mg⁻¹ (FW)。

1.2.4 无机磷含量的检测

实验中采用Ames法检测无机磷的含量。在正常和低磷培养基上生长10 d取样, 将预先称重的新鲜叶片和根组织浸没在1 mL 1%的冰醋酸中反复冻融8次。将100 μL抽提液与200 μL水和700 μL磷反应缓冲液(A: 0.48% NH₄MoO₄、2.85% H₂SO₄, B: 100 g·L⁻¹抗坏血酸, A:B=6:1)。37°C反应1 h。利用分光光度计测量溶液在820 nm波长处的光吸收值, 单位为μmol·g⁻¹ (FW)。

1.2.5 实时荧光定量PCR和反转录PCR

采用天根公司植物总RNA提取试剂盒(货号DP432)提取拟南芥的总RNA, 使用Oligo (dT)和MLV反转录酶(TaKaRa)进行反转录。选取*ACTIN2*作为内参基因, 将 *hps20* 突变体和野生型种子铺在正常和低磷培养基上, 培养8 d后分别提取根和叶总RNA, 反转录成cDNA, 进行Real-Time PCR实验以及反转录PCR。研究共检验了6个 *PSI* 基因的表达水平。这些基因包括: 2个高亲和性磷转运蛋白(*AtPT1*和*AtPT2*)、一个酸性磷酸酶(*ACP5*)、2个非编码的转录子(*At4*和*IPSI*)和一个microRNA (*miR-*

NA399D)。实验中检测基因所用引物序列见表1。使用Clustal Omega软件进行氨基酸序列比对, 使用软件Illustrator for Biological Sequences绘制基因结构图。

2 实验结果

2.1 拟南芥*hps20*突变体的筛选

我们以生长在低磷条件下的拟南芥主根长度为标准, 以T-DNA插入突变体库中的1 000个突变体为材料, 将它们点播在P-培养基上。结果筛选到一个对低磷胁迫超敏感的突变体*hps20*。在正常和低磷的培养基中, *hps20*突变体主根均比WT略短(图1-A)。正常培养基中生长的*hps20*突变体主根伸长约为WT的83%; 低磷培养基中生长的*hps20*突变体主根伸长约为WT的75% (图1-B)。上述结果表明*hps20*突变体的主根伸长对低磷胁迫更为敏感。经过两代回交, 我们收获了更纯的*hps20*突变体, 并用该种子进行了后续的表型验证实验。

2.2 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体根表面的APase活性检测

植物APase的活性谱可以直接在聚丙烯酰胺凝胶上检测出来, 这种方法称为in-gel assay (Trull和Deikman 1998)。正常和低磷条件下培养的

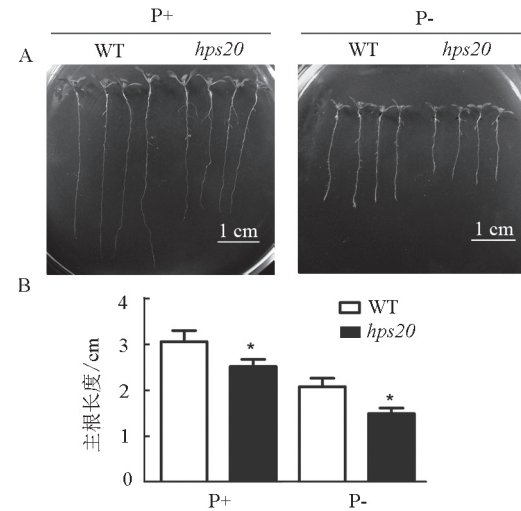


图1 拟南芥野生型和*hps20*突变体在P+和P-培养基上的表型分析

Fig.1 Phenotype analysis of WT and *hps20* of Arabidopsis on P+ and P- media

A: 正常和低磷培养基上WT和*hps20*突变体的表型; B: P+和P-培养基上WT和*hps20*主根长度。3次生物学重复实验, 误差线代表SD, *表示同一培养基上突变体与WT之间有显著差异($P<0.05$, t -test); 下图同此。

*hps20*突变体叶和根组织中的APase含量与野生型均无显著性差别(图2-A)。利用APase底物BCIP染色的方法, 发现在低磷胁迫下, *hps20*突变体根表面

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因编号	名称		引物序列 (5'→3')
AT3G18780	<i>ACTIN2</i>	F	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC
		R	GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC
AT5G03545	<i>AT4</i>	F	TGGCCCCAAACACAAGAG
		R	CGAACATTCAACAATCATAATCTCC
AT3G09922	<i>IPS1</i>	F	AGACTGCAGAAGGCTGATTGAGA
		R	TTGCCCAATTCTAGAGGGAGA
AT5G43350	<i>AtPT1</i>	F	TGATGATCTTGTGCTCTGTCG
		R	ATGACACCCTTGGCTTCGT
AT2G38940	<i>AtPT2</i>	F	CGAAGCTCCTCGGTCGTAT
		R	GGAGAGTCCCAGGCTTTTGT
AT3G17790	<i>ACP5</i>	F	CTTAAGTCCTATTGCAGGCTAGGT
		R	TTGCTAAAAATGATAGGGATGCT
AT2G34202	<i>miRNA399D</i>	F	AATACTCCTATGGCAGATCGCATTGG
		R	TCCTTTGGCAGAGAAGCATTTTACTTG
AT3G26520	<i>TIP2</i>	F	ATCACCCCAACGCACTTAGG
		R	GAACGCTGGAATTGGCTCG

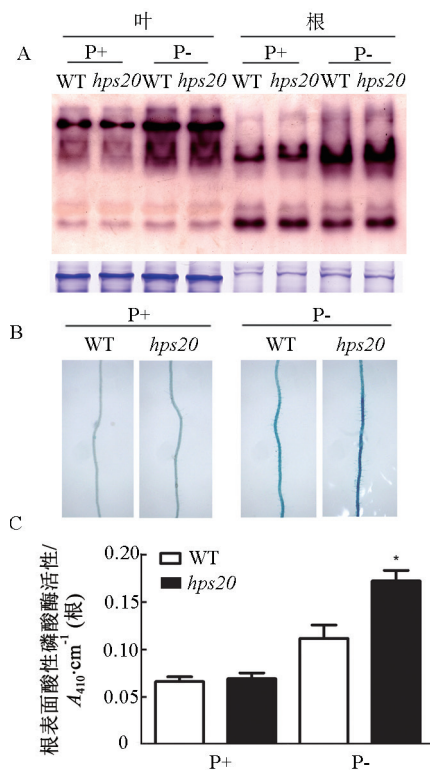


图2 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体根表面的APase活性检测

Fig.2 Detection of root-associated APase activities in Arabidopsis *hps20* under P- media

A: WT和*hps20*叶和根组织中的总APase活性; B: BCIP染色检测WT和*hps20*根表面APase活性; C: WT和*hps20*根表面的APase活性。

APase活性明显高于WT (图2-B), 是野生型的1.5倍 (图2-C)。以上结果表明, *hps20*突变体特异影响了分泌到根表面的APase活性, 而对体内的APase活性影响并不明显。

2.3 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体中花青素及Pi含量检测

为了进一步验证*hps20*突变体是否具有其他的低磷超敏感表型, 本研究对*hps20*突变体进行了花青素和Pi含量的定量测定。低磷胁迫下, *hps20*突变体较野生型积累了更多的花青素 (图3-A)。我们测定*hps20*突变体细胞内Pi含量结果发现, 无论缺磷与否, *hps20*突变体的叶中Pi含量显著低于野生型, 而根中Pi含量显著高于野生型 (图3-B)。该结果与*pho1*突变体的表型相似 (Poirier等1991), 据此猜测, *HPS20*基因可能通过调控Pi在植物体内的转运, 参与到Pi信号转导过程。

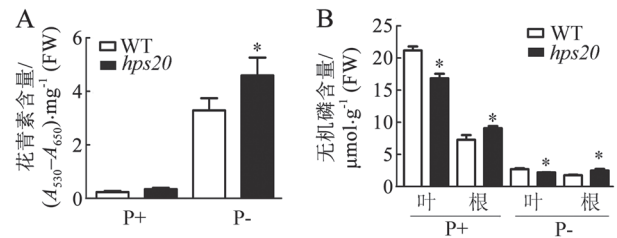


图3 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体中花青素及Pi含量检测

Fig.3 Detection of contents of Pi and anthocyanin in Arabidopsis *hps20* under P- media

A: 正常和低磷培养基上生长12 d的WT和*hps20*幼苗叶中的花青素含量; B: 正常和低磷培养基中生长10 d的野生型和*hps20*细胞内Pi含量。

2.4 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体内PSI基因超表达分析

在低磷胁迫下, 低磷诱导基因 (*Pi starvation-induced genes*, PSI基因) 会被诱导至较高的水平, 从而传递并放大低磷胁迫的信号, 引起植物体内进一步的生理生化反应以适应低磷环境。如图4所示, 在萌发后第8天, 野生型体内除了叶中 *AtPT2* 和 *ACP5* 基因的表达没有显著变化, 其余基因均受到低磷诱导表达, 证明了实验条件的正确性。低磷条件下, 除了 *AtPT1*, 5个PSI基因在*hps20*突变体组织 (根和叶) 中的表达程度显著高于野生型 (图4)。而在正常培养基上*hps20*突变体叶中 *AtPT1* 基因表达量与野生型无差别, 其余条件下*hps20*突变体体内的 *AtPT1* 基因表达水平显著低于野生型。以上结果表明, *hps20*突变抑制磷转运基因 *AtPT1* 转录, *HPS20* 蛋白可能是 *AtPT1* 的一个正向调控子。

2.5 拟南芥HPS20基因的鉴定

hps20 是一个从T-DNA插入突变体库中筛选出来的突变体, 其对应的种子号为CS484480。根据TAIR网站上的注释, 在这个株系中, 单个T-DNA插在基因AT3G26520的第一个外显子末端 (图5-A)。该基因全长为1 462 bp, 包含2个外显子和1个内含子。 *HPS20* 基因此前已经被报道, 命名为 *TIP2* (*Gamma Tonoplast Intrinsic Protein 2*), 编码一个水通道蛋白。 *TIP2* 有一个氨基酸序列相似度高达86%的同源蛋白 *TIP1* (图5-B)。在拟南芥中, *TIPs* 共有10个同源蛋白, *TIP1*、*TIP2* 以及 *TIP2;1* 均

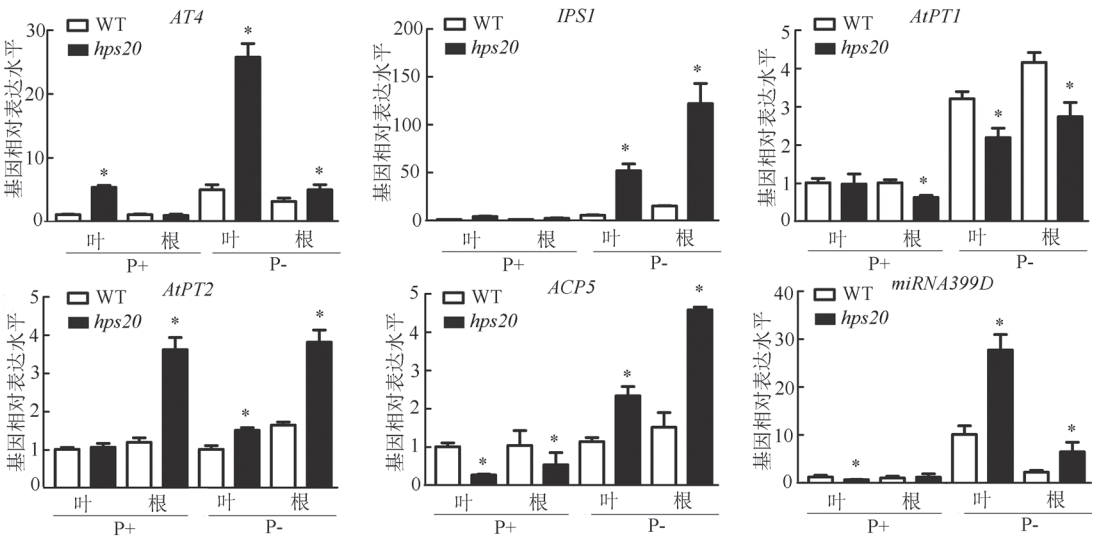


图4 低磷条件下拟南芥*hps20*突变体中低磷诱导基因的表达分析
Fig.4 Expression analysis of PSI gene in Arabidopsis *hps20* under P- media
分析时, 将在正常条件下生长的野生型中每个基因的表达量设定为单位1。

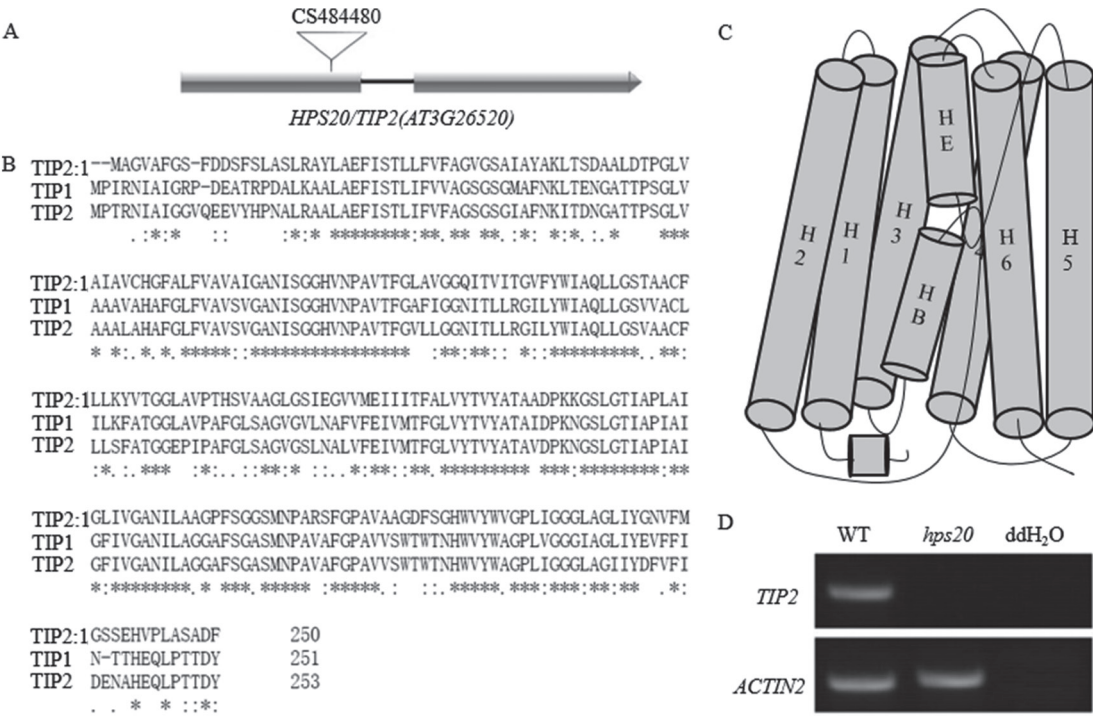


图5 *HPS20*的基因和蛋白结构
Fig.5 Gene and protein structure of *HPS20*

A: *HPS20*的基因结构, 灰色方框代表外显子, 黑线代表内含子, 空三角代表T-DNA插入的位置; B: TIP1、TIP2和TIP2.1的氨基酸序列比对, *代表相同的氨基酸; C: TIP2.1的蛋白结构, 跨膜螺旋(H1~H6)以及2个短螺旋(HB和HE); D: RT-PCR分析TIP2基因在*hps20*中表达情况, 阳性对照为WT, 阴性对照为ddH₂O。

在根中表达,三者有57%氨基酸序列相同。TIP2;1蛋白有6个跨膜域(H1~H6),在膜上形成类似桶状的构象,胞质环B以及一个膜内环E在“桶”相反的两端各自形成一个短小的 α 螺旋状结构域,即HB和HE,HB和HE两个 α 螺旋结构域各自包含一个高度保守的NPA盒,由3个氨基酸(ASh-Pro-ALa)组成(图5-C)(Kirscht等2016)。TIP2蛋白可能拥有类似结构。

为了证实*hps20*突变表型是由该T-DNA插入引起,我们用一对基因组特异性引物P1和P2进行了RT-PCR实验,结果显示*hps20*突变体中TIP2基因确实没有表达(图5-D)。

3 讨论

为了应对周围土壤的低磷环境,在长期的适应过程中,植物自身进化出一系列生理、生化和发育的反应机制。这些适应性的反应可以帮助植物更好地吸收和利用土壤中的磷。本研究中,通过筛选T-DNA插入突变体库,我们筛选到一个拟南芥低磷超敏突变体*hps20*。*hps20*突变体对低磷超敏,在低磷培养基中生长8 d之后,*hps20*突变体主根伸长受到抑制;低磷条件下,*hps20*突变体根表面分泌了大量的酸性磷酸酶;花青素积累增多;低磷诱导基因表达。研究发现,低磷条件下, Fe^{3+} 在根尖质外体中的积累,引起活性氧的产生,进而造成胼胝质在细胞壁累积,细胞壁变厚后干扰细胞间信息的交流、顶端分生组织活性的维持及细胞伸长,最终抑制主根的生长(Müller等2015)。在低磷胁迫下,植物会增加体内APase的合成(Wang等2011)。同时,分泌到根外的APase活性也增强,催化根际周围环境中的单磷脂和酸酐类水解,释放出Pi供植物利用(Del Vecchio等2015)。*hps20*突变体体内的APase活性与野生型无显著性差别,但在低磷胁迫下,*hps20*突变体根表面的APase活性是野生型的1.5倍,表明*hps20*突变体特异影响了分泌到根表面的APase活性,而对体内的APase活性影响并不明显。低磷胁迫下,植物的叶片中会积累大量的花青素,使叶片呈现暗绿或者深紫色。这种现象被认为是防止紫外线对叶片中叶绿体造成损伤的一种自我保护机制。此外,花青素的积累还

能起到保护核酸的作用,避免修补损坏的核酸分子造成体内磷元素的浪费(Stewart等2010)。低磷胁迫下,*hps20*突变体较野生型积累了更多的花青素。这些结果揭示了HPS20基因在磷信号转导的过程中处在一个比较上游的位置。

经过分子鉴定后发现,HPS20蛋白为水通道蛋白TIP2。TIPs是一类液泡膜定位的水通道蛋白,是水通道蛋白的亚家族,不仅参与植物体内水分的运输,还参与尿素、甘油、 NH_3 和 CO_2 等的运输(Beebo等2009)。TIPs基因表达的变化可能会影响水通过液泡膜的运动,从而影响植物的非生物胁迫响应(Maurel等2015)。过量表达人参TIP1的拟南芥在盐胁迫下能够积累更多的 Na^+ ,在干旱胁迫下表现出更优异的性能(Peng等2007)。对拟南芥根中TIPs进行精细定位,发现TIP2与TIP1的分布完全不同,TIP1主要在根轴中,TIP2只在根冠中表达(Gattolin等2009)。我们的研究表明HPS20/TIP2突变体对低磷胁迫超敏感,无论是否缺磷,*hps20*的叶中Pi含量较野生型低,而根中Pi含量较野生型高,此表型与*pho1*突变体表型相似。且PHO1蛋白含有6个潜在的跨膜结构域,与TIP2蛋白具有类似结构。表明TIP2可能与PHO1具有类似的功能,通过调控Pi在植物体内的转运,参与到Pi信号转导过程,在Pi和水通道两种信号通路的交互中发挥着重要的作用。

本研究中,我们发现了一个参与调控低磷胁迫响应的新组分。在后续工作中,我们需要进一步研究TIPs家族其他成员对植物磷吸收和转运的影响,寻找与TIPs相互作用的其他组分,理解TIPs如何参与调控低磷胁迫响应信号通路。

参考文献(Reference)

- Aroca R, Ruiz-Lozano JM (2012). Regulation of root water uptake under drought stress conditions. *J Exp Bot*, 63: 43–57
- Bari R, Pant BD, Stitt M, et al (2006). *PHO2*, *microRNA399*, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 141: 988–999
- Beebo A, Thomas D, Der C, et al (2009). Life with and without AtTIP1;1, an Arabidopsis aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles. *Plant Mol Biol*, 70: 193–209

- Del Vecchio HA, Ying S, Park J, et al (2015). The cell wall-targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus deprivation. *Plant J Cell Mol Biol*, 80: 569–581
- Delhaize E, Randall PJ (1995). Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107: 207
- Gattolin S, Sorieul M, Hunter PR, et al (2009). *In vivo* imaging of the tonoplast intrinsic protein family in Arabidopsis roots. *BMC Plant Biol*, 9: 133
- Hamburger D, Rezzonico E, Pet  tot JMDC, et al (2002). Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell*, 14: 889–902
- Kirscht A, Kaptan SS, Bienert GP, et al (2016). Crystal structure of an ammonia-permeable aquaporin. *PLoS Biol*, 14: e1002411
- Lin SL, Chiang SF, Lin WY, et al (2008). Regulatory network of *microRNA399* and *PHO2* by systemic signaling. *Plant Physiol*, 147: 732–746
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, et al (2015). Aquaporins in plants. *Physiol Rev*, 95: 1321–1358
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, et al (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 595–624
- M  ller J, Toev T, Heisters M, et al (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Dev Cell*, 33: 216–230
- Peng YH, Lin WL, Cai WM, et al (2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. *Planta*, 226: 729–740
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, et al (1991). Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol*, 97: 1087–1093
- Raghothama KG (2000). Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 182–187
- Reichow SL, Gonen T (2008). Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. *Structure*, 16: 1389–1398
- Reinhardt H, Hachez C, Bienert MD (2016). Tonoplast aquaporins facilitate lateral root emergence. *Plant Physiol*, 170: 1640
- Rubio V, Linhares F, Solano R, et al (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*, 15: 2122–2133
- Schussler MD, Alexandersson E, Bienert GP, et al (2010). The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 56: 756–767
- Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, et al (2010). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ*, 24: 1189–1197
- Trull MC, Deikman J (1998). An Arabidopsis mutant missing one acid phosphatase isoform. *Planta*, 206 (4): 544–550
- Wang LS, Li Z, Qian WQ, et al (2011). The Arabidopsis purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. *Plant Physiol*, 157: 1283–1299
- Wudick MM, Luu DT, Maurel C (2010). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol*, 184: 289–302
- Yuan H, Liu D (2010). Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation. *J Integr Plant Biol*, 50: 849–859

Preliminary study on tonoplast intrinsic protein 2 participating in phosphate starvation signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*

LI Xian-Huang¹, XU Ya-Nan¹, ZHU Chun-Feng¹, ZHAO Chen-Guang², KANG Jun^{1,*}

¹*School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China*

²*Center of Biomedical Analysis, Tsinghua University, Beijing 100084, China*

Abstract: Phosphorus is one of the most important macronutrients required for plant growth and development. Under phosphate (Pi) deficiency, plants exhibit a series of adaptive responses. In this work, we identified an *Arabidopsis* mutant, *hypersensitive to Pi starvation 20* (*hps20*), which displayed increased sensitivity in Pi starvation responses. Expression level of Pi starvation-induced (PSI) genes in *hps20* mutant were much higher than those in wild type (WT) plants under Pi deficiency. Production of acid phosphatase (APase) was also enhanced in *hps20* mutant under Pi starvation. Furthermore, *hps20* mutant accumulated more anthocyanin than WT when grown on Pi-deficient medium. RT-PCR analysis indicated that the phenotypes of *hps20* mutant were caused by mutation within the *TIP2* (*Gamma Tonoplast Intrinsic Protein 2*) gene. The Pi content in the leaves of *hps20* mutant were lower than those of the wild type, while it were higher in roots than those in WT under either Pi sufficiency or deficiency conditions, which was similar to the phenotype of the *pho1* mutant. This indicates that *TIP2* gene may participate in the Pi signal transduction process by regulating the transport of Pi in plants.

Key words: Pi starvation stress; *Arabidopsis thaliana*; *hps20* mutant; *TIP2* gene; Pi transporter

Received 2019-02-19 Accepted 2019-09-25

This work was supported by Tianjin Natural Science Foundation Youth Project (16JCQNJC09800).

* Corresponding author (jun.kang@tju.edu.cn).