



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Végétale et Forestière

par **Marline Veronica PEREDA CAMPOS**

**Contribution à l'étude des transporteurs de phosphate de
la famille PHT1 chez le Peuplier (*Populus trichocarpa*
Torr. & Gray) et le champignon ectomycorhizien *Laccaria*
bicolor (Maire) P. D. Orton**

Soutenance publique le 15 Décembre 2008

Président du Jury :

M. Michel Chalot

Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy

Rapporteurs :

M. Roland Marmeisse

Chargé de recherche, CNRS, Lyon 1

Mme. Claude Plassard

Chargée de recherche, INRA Montpellier

Examineurs :

M. Francis Martin

Directeur de Recherche, INRA Nancy

M. Daniel Wipf

Professeur, Université de Bourgogne

Laboratoire Interactions Arbres Micro organismes UMR 1136 INRA/UHP
INRA Nancy-54280 Champenoux

A la vida que me permitio
conocerte y nos dio nuestro
mas grande tesoro :
Maya y Lorena

INTRODUCTION	10
1 LE PHOSPHORE DANS LE SOL.....	10
1.1 LE PHOSPHATE : MACRONUTRIMENT VITAL	12
1.2 REPONSES ADAPTATIVES DES PLANTES A LA DISPONIBILITE EN PI.....	14
2 LA MYCORHIZATION ET SES EFFETS SUR LA NUTRITION PHOSPHATEE	15
2.1 LES DIFFERENTS TYPES DE MYCORHIZES	17
2.1.1 <i>Les ectomycorhizes</i>	17
2.1.2 <i>Les endomycorhizes</i>	20
2.1.3 <i>Les ectendomycorhizes</i>	21
3 LE TRANSPORT DU PI A TRAVERS LES MEMBRANES.....	23
4 TRANSPORTEURS DE PI CHEZ LES PLANTES ET LES CHAMPIGNONS	24
4.1 SYMPORTS Pi:H^+	27
4.1.1 <i>Famille Pht1</i>	27
4.1.2 <i>Famille Pht2</i>	30
4.1.3 <i>Famille Pht3</i>	30
SYMPORTS $\text{Na}^+:\text{Pi}$	32
4.1.4 <i>Famille PHT4</i>	32
4.2 ANTIPOORTEURS/ TRANSLOCATEURS DE PI.....	32
5 TRANSPORTEURS BACTERIENS	34
6 TRANSPORTEURS DE PI DES LEVURES.....	34
7 TRANSPORTEURS DE PI DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX NON MYCORHIZIENS	36
8 ABSORPTION DU PI CHEZ LES CHAMPIGNONS AM.....	38
8.1 GENES DE LA FAMILLE PHT1 CHEZ LES PLANTES IMPLIQUEES DANS LA SYMBIOSE AM ET LA CONSERVATION EVOLUTIVE DE LEUR REGULATION	40
9 TRANSPORT DE PI CHEZ LES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS	44
10 CONCLUSIONS DES ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES	47

Avant propos

Ce travail a été effectué au Laboratoire Interactions Arbres-Micro organismes de l'INRA de Nancy. Je remercie tout d'abord le directeur du laboratoire, M. Francis Martin de m'avoir proposé un sujet d'étude aussi intéressant et de m'avoir guidée avec sa grande expérience scientifique de la physiologie des arbres. Tout mon respect pour ses compétences scientifiques et ses conseils. Je suis de plus très reconnaissante de son soutien au niveau humain.

Je remercie M. Michel Chalot, M. Roland Marmeisse, Mme. Claude Plassard, M. Daniel Wipf de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Pouvoir discuter avec des spécialistes de transporteurs et d'écologie microbienne sera certainement très enrichissant pour nous tous ici.

Je remercie également à tous les membres du laboratoire à l'INRA et à la Faculté: Annegret Kohler, Marc Buée, Sébastien Duplessis, Christine Delaruelle, Beatrice Palin, Dominique Vairalles, Jean Garbaye, François Le Tacon, Valérie Legué, Joëlle Gérard, Damien Blaudez, Annick Brun, pour tous ses conseils techniques, et avoir été toujours très disponibles. Un grand merci à tous les autres étudiants du laboratoire que j'ai côtoyé depuis mon DEA : Pierre-Emmanuel, Aurélie, Cécile, David, Martina, Anne, Joanne, Marlis, François, André, Stéphane, Jessy, Benoît, Marie-Pierre, Julien, Eva, Aude, Jérémy, Frédéric et surtout merci à Judith et Valérie qui m'ont tant aidée pendant mon absence pour que ce manuscrit soit achevé.

Abréviations

°C	degré celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BET	Bromure d'éthidium
dNTP	Désoxyribonucleotide triphosphate
ECM	Ectomycorhize
EST	Expressed Sequenced Tag
JGI	Joint Genome Institute
PCR	Polymerase Chain Reaction`
P	Phosphore
Pi	Phosphate inorganique
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription-PCR

Contexte & objectifs du projet de recherche

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche concertée entre l'équipe de '*Microbiologie Forestière*' et l'équipe '*Physiologie & génomique fonctionnelle du transport*' de l'UMR '*Interactions Arbres/Micro-organismes*' (IaM) sur l'étude des voies de l'absorption et de l'assimilation du phosphore chez les ectomycorhizes. Il a pour objectif de comprendre les mécanismes de régulation qui permettent la mise en place et le maintien de l'homéostasie du phosphate au sein de la symbiose ectomycorhizienne.

Les données accumulées dans la littérature et les questions soulevées par différents auteurs (Read & Smith, 1997 ; Bucher, 2007 ; Javot et al., 2007) nous ont donc amené à *étudier la régulation de l'absorption de l'orthophosphate (Pi) chez le champignon basidiomycète ectomycorhizien Laccaria bicolor et l'un de ses hôtes, le Peuplier (Populus trichocarpa)*.

Le Peuplier doit sa notoriété pour avoir été choisi comme modèle d'étude du développement et du fonctionnement des arbres (Wullschleger *et al.*, 2002). Son importance économique, l'existence de protocoles de multiplication végétative et de transformation génétique efficaces, la construction de plusieurs cartes génétiques, associés à une croissance rapide, ont hissé en quelques années le Peuplier au rang d'organisme modèle en biochimie, physiologie et génétique forestières (Wullschleger *et al.*, 2002). La taille relativement faible de son génome, 520 millions de paires de bases (un génome diploïde comprenant 38 chromosomes) est un atout supplémentaire. Cet

ensemble d'atouts a logiquement conduit la communauté scientifique à proposer le séquençage de son génome en 2002. Les retombées de ce projet, mené par le Joint Genome Institute (JGI) du Département à l'Energie américain (DOE), sont immédiates pour les programmes de recherche sur cette espèce modèle, mais elles sont aussi importantes pour les autres arbres. Après l'Arabette des Dames (*Arabidopsis thaliana*) en 2000 et le Riz (*Oryza sativa*) en 2002, le Peuplier est le premier arbre dont le génome soit entièrement séquencé (Tuskan *et al.*, 2006). Le séquençage des 520 Mpb de son génome, associé au déploiement des outils de la génomique fonctionnelle et de la protéomique, ouvre de nouvelles perspectives en biologie forestière et permettra de mieux comprendre les traits de vie unique à ces plantes pérennes, telles que leur longévité et la formation du bois.

Le choix de *L. bicolor* S238N est justifié par le fait que son génome ait été séquencé dans le cadre d'un programme international coordonnée par l'UMR IaM (Martin *et al.*, 2008) qui se propose de séquencer le génome de plusieurs champignons biotrophes associés au Peuplier (Martin *et al.*, 2004). De plus, ce champignon symbiotique est très utilisé en mycorhization contrôlée en pépinière forestière pour son effet symbiotique positif sur la croissance de la plupart des espèces d'intérêt sylvicole, tel que le Sapin de Douglas (Le Tacon & Bouchard, 1991). De plus, *L. bicolor*, qui se prête bien à la culture sur milieu synthétique, a fait l'objet de nombreuses études métaboliques et biochimiques en laboratoire.

Après avoir décrit dans la section "Analyse Bibliographique" les connaissances actuelles sur les symbioses ectomycorhiziennes et leur impact sur la nutrition phosphatée des plantes, je décrirai les données récentes acquises sur les transporteurs

de phosphate chez les plantes, les champignons et les symbioses mycorhiziennes. Les résultats expérimentaux obtenus sur les transporteurs de Pi de la famille PHT1 chez *L. bicolor* et *P. trichocarpa* seront exposés sous forme de publications (Section 3) :

- Dans une première étape, j'ai participé à l'annotation des génomes du Peuplier et de *L. bicolor* et j'ai caractérisé les différentes familles de transporteurs de Pi chez ces deux organismes (Publications n°1 et n°2).
- Dans une seconde étape, j'ai étudié la structure, l'évolution et l'expression des transporteurs de la famille PHT1 chez *L. bicolor* (Publication n°3).
- Enfin, j'ai caractérisé la structure, l'évolution et l'expression des transporteurs de la famille PHT1 chez *P. trichocarpa* (Publication n°4).

Dans la "*Discussion & Conclusions Générales*", je résumerai les données acquises dans ce projet de recherche et j'intégrerai mes résultats aux modèles de régulation du transport de Pi de la symbiose ectomycorhizienne préalablement discutés (*Analyse Bibliographique*).

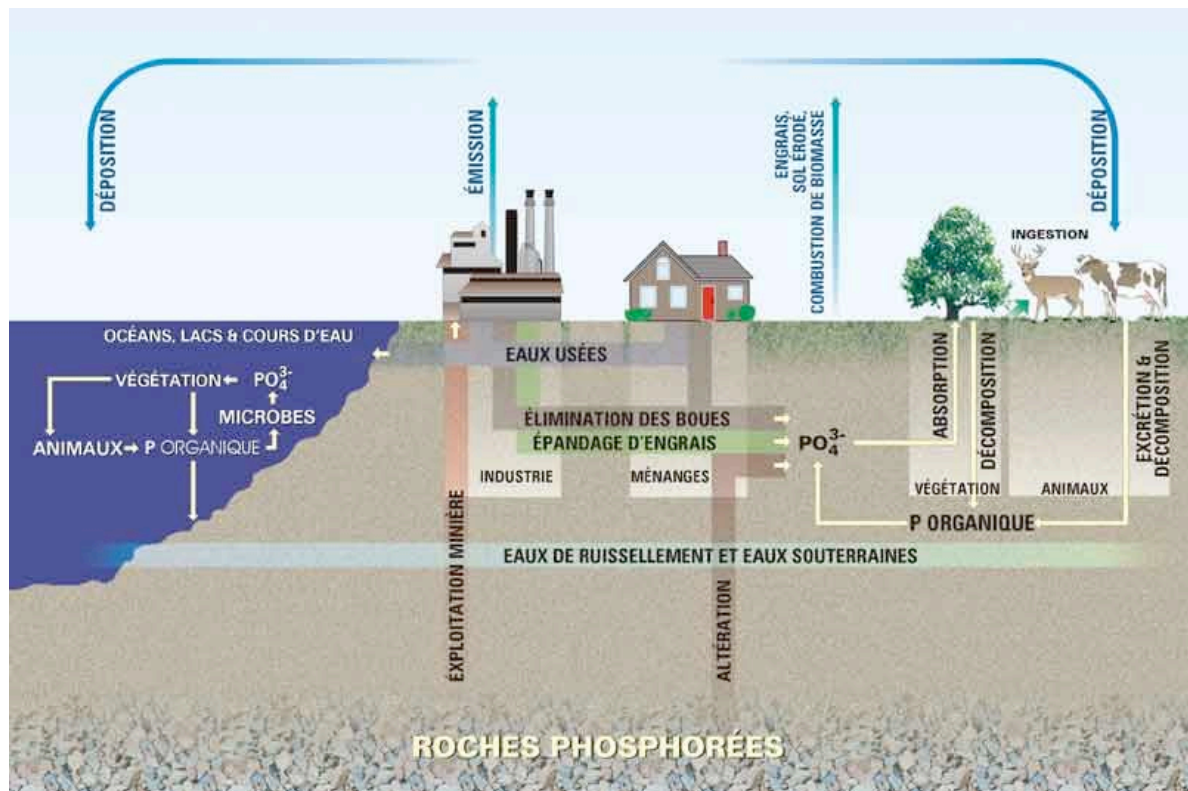


Figure 1. Cycle du Phosphore. Avant l'urbanisation, l'industrialisation et l'agriculture intensives, le phosphore ne se déposait dans les sols que par érosion des roches. Il est prélevé du sol, principalement sous forme de composés d'orthophosphate, par les racines ou d'autres cellules des végétaux et migre dans la chaîne alimentaire des herbivores jusqu'aux carnivores. Lorsque les animaux excrètent le phosphore en excès sous forme de sels de phosphore dans leur urine, le phosphore est soit absorbé directement par des organismes, soit transformé en orthophosphate par des bactéries capables de phosphatation. La décomposition des matières organiques retourne également le phosphore dans le sol. Le phosphate est extrêmement réactif et se lie au fer, au calcium et à bien d'autres éléments pour former des composés relativement insolubles. Cette liaison entraîne le retrait du phosphate des écosystèmes terrestres et aquatiques et son accumulation. Source : Chambers *et al.*, 2001.

INTRODUCTION

1 Le Phosphore dans le sol

Les différentes formes de P dans le sol sont classées selon différents critères: la nature des composés phosphorés, le fractionnement chimique ou l'échange ionique. La nature des composés phosphorés permet de séparer le P organique du P inorganique. La répartition entre

ces deux catégories dépend du type de végétation, de l'historique de fertilisation, du type de cultures et du type de sol (Bolan, 1991). De façon générale, le P insoluble (et donc pas directement disponible) représente 95% à 99% du P total. Le cycle du phosphore diffère du cycle de l'azote par le fait que le principal réservoir n'est pas l'atmosphère, mais la croûte terrestre. Le phosphore atmosphérique provient de l'érosion des sols et des roches ; de la dérive des engrais et des émissions industrielles (Chambers *et al.*, 2001). Cependant, Il n'existe pas de gaz important contenant du phosphore. Le cycle du phosphore diffère également de celui de l'azote car les étapes sont moins nombreuses et ne dépendent pas de l'activité de groupes spécifiques de micro-organismes (Figure 1).

La quantité de phosphore présente dans un sol est donc conséquence directe de la richesse de la roche mère. Mais la connaissance de cette quantité ne donne qu'une indication très imparfaite sur l'aptitude du sol à fournir du phosphore aux végétaux et à satisfaire leurs exigences. Le sol est un environnement hétérogène et la disponibilité du phosphate varie considérablement puisqu'il est fortement lié à des composants organiques et inorganiques du sol. Le P organique représente de 20 à 80% du P du sol. Il est présent sous forme de P soluble dans la solution du sol et sous forme de P insoluble absorbé sur les particules du sol ou comme composant de la matière organique du sol. Le phosphate organique est présent comme phosphates d'inositol, phospholipides, acides nucléiques et divers autres esters de phosphate qui sont issus de la dégradation de la matière organique et ils sont souvent immobilisés par sorption et fixation aux colloïdes du sol (Marschner, 1995). Le phosphore organique est l'objet d'une lente minéralisation qui le rend progressivement disponible pour les végétaux.

Zone d'épuisement du P

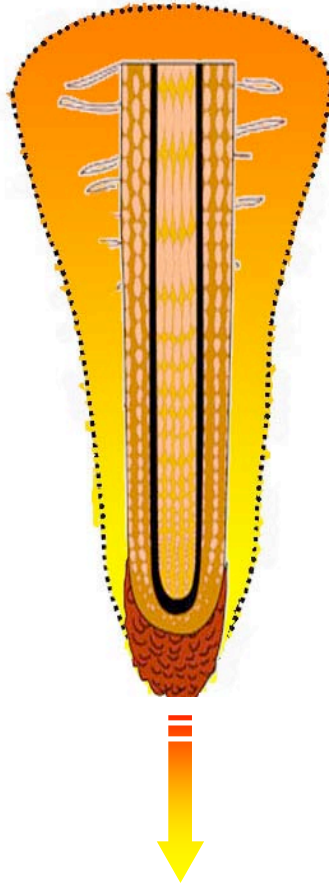


Figure 2. Coupe transversale d'un apex d'une racine primaire. Le pointillé indique la limite de la zone d'épuisement de P. La flèche indique la direction de la croissance.
Source : Poirier et Bucher, 2002.

La minéralisation du P organique dépend de l'activité de micro organismes du sol mais également des invertébrés comme les vers de terre (Tate, 1984). Le P inorganique est présent sous trois formes: soluble dans la solution du sol, absorbé et précipité. Le P de la solution du sol constitue moins de 1% du P total, mais est la source principale de P pour les végétaux. Le P absorbé ou précipité est principalement sous forme de phosphate de fer ou d'aluminium dans les sols acides et sous formes de phosphate de calcium et de magnésium dans les sols alcalins et calcaires. La distribution relative entre les différentes catégories et la disponibilité dépend notamment du pH du sol (Bolan, 1991).

La concentration du phosphate inorganique, en général, n'atteint que des niveaux très faibles, de l'ordre du 10 μM et souvent dans la rhizosphère la concentration peut chuter à des niveaux sub-micromolaires. Le phosphore est absorbé par les plantes seulement en forme ionique, c'est-à-dire dans la forme d'orthophosphate (H_2PO_4^- , phosphate inorganique, Pi). Les prélèvements d'orthophosphate par les plantes entraînent un épuisement des formes solubles. Au fur et à mesure des nouveaux prélèvements, les formes de P qui sont sollicitées pour reconstituer le stock de P dissous sont de moins en moins mobiles, car elles sont de plus en plus énergiquement retenues par le pouvoir fixateur du sol. Les interactions électrostatiques du phosphate avec les particules du sol et la séquestration à la surface des argiles font que le phosphate est l'ion majeur le moins diffusible. Cette faible mobilité a pour conséquence que l'ion est absorbé par la racine « plus vite » dont il ne migre pas dans le sol. Une zone d'épuisement de 1 à 2 mm de large se forme donc autour de la racine (Figure 2).

1.1 Le phosphate : macronutriment vital

Le phosphore constitue un des macronutriments clé pour la croissance et le métabolisme. Le phosphate joue un rôle important dans le transfert de l'énergie avec la formation des esters de phosphate qui sont riches en énergie. L'ATP, qui fournit l'énergie nécessaire pour toutes les réactions de synthèse et autres réactions exigeant de

l'énergie comme l'absorption des éléments nutritifs à travers les membranes des cellules racinaires en cas d'absorption active. Il est aussi un composant essentiel des macromolécules comme les nucléotides, phospholipides et sucres phosphatés (Bielecki, 1973; Leggewie *et al.*, 1997).

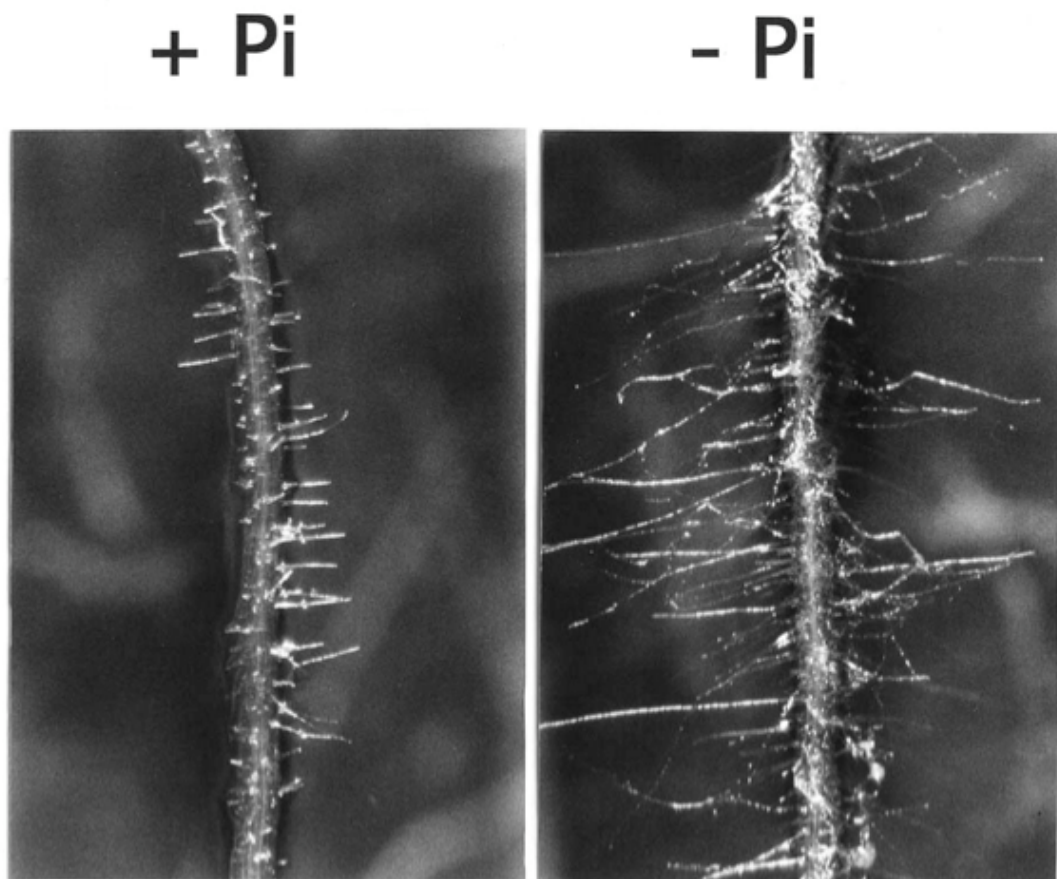


Figure 3. La carence en Pi entraîne des changements morphologiques des poils absorbants. Racines d'*Arabidopsis* après 10 jours de croissance en boîte petri avec 5mM (+Pi) ou 5 μ M (-Pi). Source : Poirier et Bucher, 2002.

Le phosphate, en soi même, intervient dans de nombreux processus chez les plantes soit comme substrat, soit comme produit final des différentes réactions métaboliques. Il est aussi impliqué dans la régulation de l'activité enzymatique via la phosphorylation (Marschner and Dell, 1994). La concentration de P_i cytosolique a un impact sur la photosynthèse (Sivak and Walker, 1986; Usuda, 1995; Leggewie, *et al.*, 1997) et la partition du carbone (Rao and Terry, 1989). Il a été montré que le phosphore améliore la réponse de plusieurs cultures à la fertilisation azotée, surtout les céréales. Pour que les plantes utilisent le supplément d'azote (par exemple pour la synthèse des protéines ou de la chlorophylle), elles ont besoin de plus de phosphore pour fournir l'ATP nécessaire.

1.2 Réponses adaptatives des plantes à la disponibilité en P_i

Dans la plupart des sols, la mobilisation et l'acquisition du phosphate limite souvent la croissance des plantes. Pour pouvoir faire face à cette contrainte dans l'acquisition de ce nutriment vital, les plantes ont développé une série d'adaptations métaboliques pour maintenir un niveau de croissance stable (Wang *et al.*, 2004). Les réponses physiologiques observées sont un taux d'absorption du P_i augmenté et il existe une meilleure efficacité dans l'utilisation du P_i car le P_i interne est recyclé (Raghothama, 1999; Poirier and Bucher, 2002; Bari R *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006). En ce qui concerne le recyclage du P_i (mobilisation des réserves), il faut signaler que le transport du P_i est un processus dynamique qui a lieu à travers les nombreuses membranes des organelles, des cellules et des tissus. Une fois que le phosphate a été absorbé par les racines, il est distribué aux différents «tissus-puits» comme les racines en croissance, les jeunes feuilles, les fleurs et les graines. Les racines exsudent aussi des acides organiques, des phosphatases et des nucléases pour solubiliser ou libérer le P_i à partir des sources organiques (remobilisation). Une réponse morphologique est aussi présente face à une carence en phosphate. Par exemple, la croissance et l'architecture des racines sont altérées à fin de parvenir à couvrir un volume de sol plus grand en augmentant la densité des poils absorbants et il existe aussi une réduction des parties aériennes (Figure 3). La carence en phosphate développe chez les plantes également des réponses moléculaires comme la surexpression de RNAses, la production accrue des acides organiques comme le malate et le citrate, qui entrent en compétition avec le P_i pour s'associer aux molécules liés aux cations, les phosphatases pour minéraliser le P_i des

composés organiques et aussi des transporteurs de Pi (Lefebvre *et al.*, 1990; Poirier and Bucher, 2002). Des expériences récentes ont démontré que des plantes transgéniques qui surproduisent des phosphatases ou des acides organiques sont plus résistantes à des conditions de faible teneur en Pi dans le sol (López-Bucio *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006). Une autre stratégie des plantes est de promouvoir des associations symbiotiques avec des champignons mycorhiziens pour pouvoir bénéficier de leur forte capacité à acquérir le Pi.

2 La mycorhization et ses effets sur la nutrition phosphatée

Les mycorhizes sont des associations symbiotiques contractées par les racines des végétaux avec certains champignons du sol. La mycorhization est extrêmement répandue : 95% des espèces végétales connues sont mycorhizées. L'absorption par les racines des éléments minéraux de la rhizosphère et du sol se voit favorisée par la présence de mycorhizes (Malloch *et al.*, 1980). Elles améliorent ainsi la nutrition de la plupart des espèces végétales. Les plantes reçoivent du partenaire fongique de l'azote, du phosphore (Mosse, 1973) et d'autres minéraux (Marschner and Dell, 1994) et voient leur approvisionnement en eau amélioré. En retour, le champignon reçoit de la plante-hôte des photoassimilats. En effet, le champignon mycorhizien est faiblement saprophytique dans le cas des ectomycorhiziens voir pas du tout pour les endomycorhiziens. Cette amélioration de la nutrition carbonée lui permet de se développer dans le sol et de mener à terme sa reproduction sexuée. La plante-hôte profite d'autres avantages sélectifs comme une protection phytosanitaire accrue (Dehne, 1982) et une meilleure aptitude à coloniser des terrains pollués par des métaux lourds (Galli *et al.*, 1994). Si le sol d'une forêt est considéré comme pauvre en phosphore et azote au regard des besoins d'une plante, il contient en fait de nombreux détritux végétaux en voie de décomposition. Ces détritux renferment des formes complexes de matières organiques (protéine, lignine, acides nucléiques, entre autres) non utilisables directement par la plante, mais piégeant une quantité importante d'azote et phosphore. Grâce à l'excrétion de protéases, phosphatases, phosphodiesterases, acides organiques, par exemple, le champignon va pouvoir métaboliser ces formes complexes, solubiliser des éléments cristallisés, et rendre assimilables l'azote et le phosphore dont la plante a

besoin pour sa croissance (Martin *et al.*, 1997; Plassard *et al.*, 2000).

Les champignons, en exploitant cette ressource, améliorent nettement la nutrition des plantes en phosphore et en azote (Landeweert *et al.*, 2001). Le mycélium fongique peut être 100 fois plus long que les poils absorbants des plantes et il peut se ramifier pour améliorer l'efficacité d'absorption des nutriments au-delà de la zone d'épuisement du Pi (Jakobsen *et al.*, 1992).

L'effet positif de la mycorhization n'a pas pour seule origine le fait qu'elle permet aux plantes d'accéder au Pi situé au-delà de la zone d'épuisement. L'amélioration de la nutrition de P par les mycorhizes résulte probablement de plusieurs phénomènes agissant de façon synergique. L'augmentation de la surface d'absorption et l'exploration d'un plus grand volume de sol, mais aussi l'expression par le champignon de systèmes d'absorption ayant une affinité supérieure à ceux de la plante et la capacité du champignon à utiliser le Pi contenu dans des composés inaccessibles à la plante seule (Bielecki, 1973).

Les champignons mycorhiziens mettent également à la disposition de la plante associée des formes de phosphore généralement mal utilisées par les Végétaux Supérieurs: phytate, polyphosphates du sol.

Les travaux menés à ce jour sur les ectomycorhizes et les endomycorhizes favorisent l'hypothèse selon laquelle la stimulation de la nutrition phosphatée de la plante-hôte résulte aussi de la capacité des champignons associés à accumuler de grandes quantités de phosphore (Marschner and Dell, 1994).

Les structures engendrées par l'association mycorhizienne peuvent être classées sur la base de critères écologiques, morphologiques et physiologiques. On distingue plusieurs types de mycorhizes : les endomycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes, et les ectendomycorhizes, ainsi que des mycorhizes arbutoides, monotropoides et orchidoïdes (Harley, 1984).

2.1 Les différents types de mycorhizes

2.1.1 Les ectomycorhizes

Les ectomycorhizes sont établies entre des champignons basidiomycètes ou ascomycètes et les racines fines d'espèces ligneuses. Elles constituent le deuxième groupe de mycorhizes les plus fréquemment rencontrées. Les ectomycorhizes ne se rencontrent pratiquement que sur des espèces ligneuses (Fagacées, Bétulacées, Salicacées, Pinacées, Dipterocarpacees...); Les 30 familles végétales formant des ectomycorhizes ne représentent

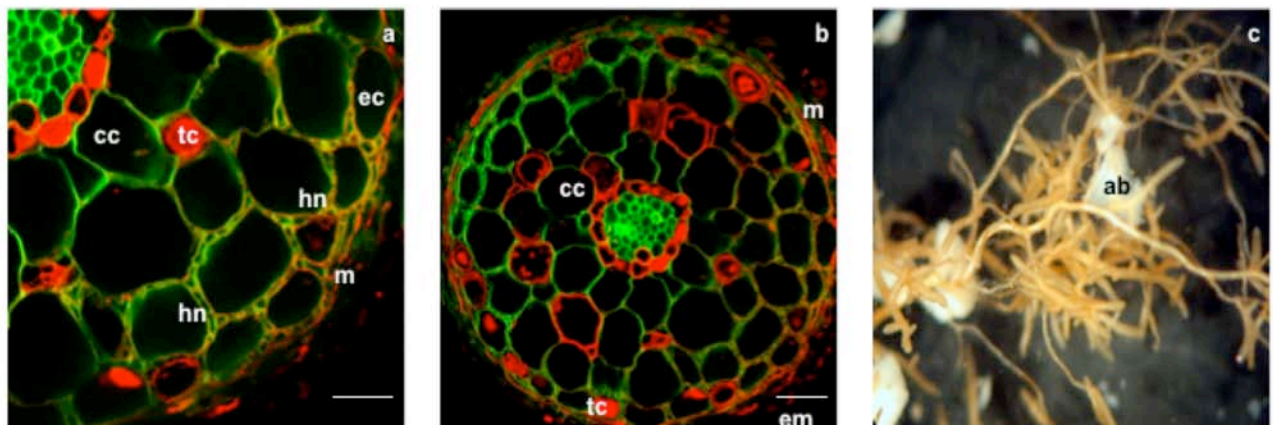


Figure 4. **a et b.** Coupe longitudinale d'une ectomycorhize de *Populus trichocarpa/Laccaria bicolor* (cc : cellule du cortex, tc : tannins, hn : Réseau d'Hartig, ec : cellule de l'épidermie, m : manteau fongique). **c.** vue macroscopique des ectomycorhizes (ab : inoculum de *L.bicolor* en billes d'alginate).

pas plus de 3% des taxa végétaux mais elles constituent l'essentiel des forêts des régions tempérées, montagneuses, boréales et de certaines forêts tropicales (Harley, 1984). Dans les forêts tempérées et boréales, 95% des racines courtes forment des ectomycorhizes (Smith and Read, 1997). Les champignons ectomycorhiziens représentent plus de 5000 espèces fongiques (Barker *et al.*, 1998).

Les ectomycorhizes forment deux structures spécifiques : le manteau et le réseau de Hartig. Le manteau fongique est constitué d'hyphes agglomérées enveloppant la racine. Le réseau de Hartig est constitué d'hyphes qui ont pénétré entre les cellules et l'épiderme et du cortex racinaires sans traverser la paroi (Figure 4). L'établissement d'ectomycorhizes provoque une modification de la morphologie de la racine courte qui est hypertrophiée et de forme variable (simple, dichotome, noduleuse...) (Smith and Read, 1997).

La morphologie du système racinaire est un facteur déterminant qui conditionne les possibilités de croissance de l'arbre dû à l'existence d'une zone d'épuisement de phosphate dans la rhizosphère. Toute augmentation de la surface racinaire, en particulier par l'intermédiaire des hyphes ectomycorhiziens associés, permettra de restaurer une alimentation en phosphate normale. D'ailleurs, l'effet bénéfique de la symbiose mycorhizienne sur la croissance de la plante-hôte résulte en grande partie de l'amélioration de la nutrition phosphatée.

Les champignons ectomycorhiziens contribuent de deux manières à améliorer la disponibilité en phosphore des arbres-hôtes. Ils augmentent la quantité de Pi absorbé par le système racinaire en augmentant la surface d'échange racine-sol. Les champignons mycorhiziens peuvent fournir environ 70% de Pi absorbé par les racines mycorhizées. Cependant, les hyphes créent également autour d'elles une zone de déplétion et l'absorption ne peut continuer que si leur croissance permet d'accéder à de nouvelles zones du sol (Smith and Read, 1997).

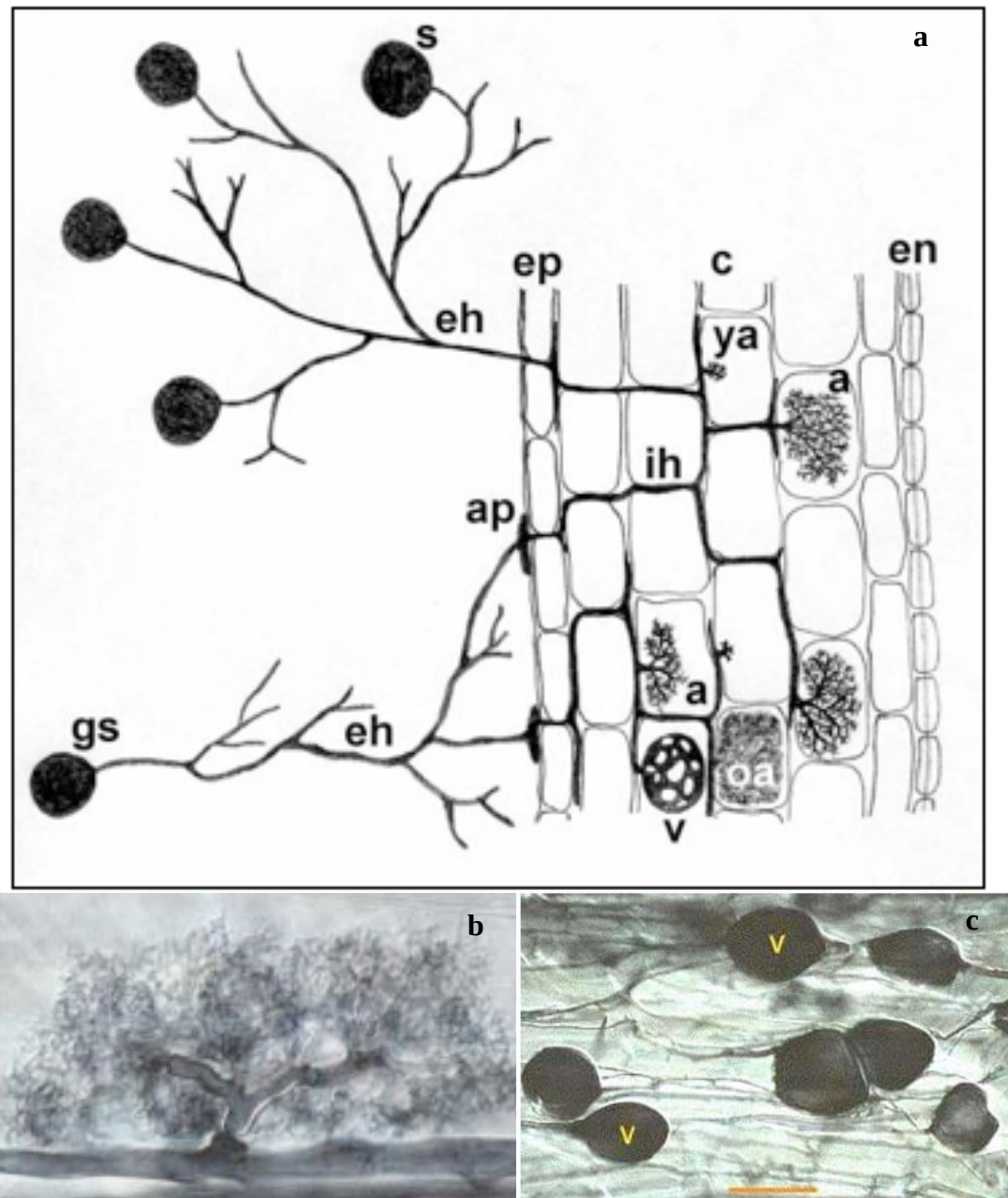


Figure 5. a. Structures typiques de la symbiose à vésicules et à arbuscules.(s : spore, eh : hyphes extramatricielles, ap : appressorium, ep : epidermie, c : cortex, en : endoderme, ih : hyphes intercellulaires, v : vésicule, a : arbuscule, oa : arbuscule mature ; ya : jeune arbuscule) **b.** Arbuscule : Cette structure fongique a un rôle dans le transfert des nutriments depuis le champignon vers la plante-hôte et viceverse. **c.** Vésicules (v). structures fongiques qui se développent entre ou dans les cellules corticales de la plante-hôte. Les vésicules contiennent des lipides importants pour le stockage.

Source : <http://www.jic.ac.uk/STAFF/giles-oldroyd/Calcium%20signalling/calcium.htm>.

2.1.2 Les endomycorhizes

Dans ce type de symbiose, la morphologie de la racine mycorhizée n'est pas modifiée. Les hyphes extramatricielles du champignon ne forment pas de manteau autour de la racine. Les hyphes progressent dans le cortex racinaire au niveau des méats et entre les cellules. Ils franchissent les parois et repoussent le plasmalemme des cellules-hôtes sans le traverser. Le champignon forme deux types de structures caractéristiques : les arbuscules (rôle dans les échanges avec les cellules racinaires) et les vésicules (rôle de stockage). Environ 80% des champignons forment des vésicules et des arbuscules et les 20% restant forment uniquement des arbuscules (Figure 5). Les arbuscules sont formés dans les cellules corticales et les vésicules dans ou entre les cellules corticales (Abbott, 1982).

2.1.2.1 Endomycorhizes à vésicules et à arbuscules

Les associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules (VA) concernent environ 80% des espèces végétales parmi lesquelles essentiellement des plantes herbacées mais aussi quelques espèces ligneuses appartenant aux Angiospermes (*Acer*, *Populus*, *Alnus*, *Fraxinus*, ...) ou aux Gymnospermes (*Cupressus*, *Sequoia*, *Podocarpus*, ...). Les champignons formant ces endomycorhizes VA appartiennent à la famille des Glomales. Des ecto- et des endomycorhizes sont souvent simultanément présentes sur un petit nombre d'espèces ligneuses appartenant aux Salicacées, Bétulacées, Juglandacées, Myrtacées, Césalpinioïdées...

Les endomycorhizes VA sont les plus anciennes. Les premières manifestations de ce type de symbiose auraient eu lieu il y a entre 353 et 462 millions d'années (Simon *et al.*, 1993) et cette symbiose aurait joué un rôle important lors de la colonisations de terres émergées par les plantes vasculaires (Selosse, 2000).

Les végétaux impliqués dans ce type de symbiose représentent 80% des espèces végétales. Moins de 200 espèces fongiques appartenant à six genres forment ce type de mycorhizes. Les champignons impliqués dans ce type de symbiose sont des symbiotes obligatoires, ce qui rend les études génétiques difficiles. La ploïdie du noyau de ces champignons est toujours inconnue (Barker, *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Mycorhizes éricoïdes

Ce type d'endomycorhizes est formé entre les plantes appartenant aux Ericales et des champignons ascomycètes. Ces mycorhizes développent des complexes denses d'hyphes à l'intérieur de la racine ; elles sont dites mycorhizes « à pelotons ». Ces champignons forment un mucilage au niveau de l'extrémité de la racine. Le mucilage s'étend le long de la racine en s'amincissant et forme un manteau fin en surface de la racine (Smith and Read, 1997).

2.1.2.3 Mycorhizes orchidoïdes

Ces endomycorhizes sont formées entre les Orchidacées et des champignons basidiomycètes. Elles ont une grande importance durant toute la partie du cycle vital des Orchidacées au cours de laquelle ces espèces dépendent de la mycorhization pour obtenir des substrats carbonés (Smith and Read, 1997). Ce sont, elles aussi, des mycorhizes « à pelotons ».

2.1.3 Les ectendomycorhizes

Ces mycorhizes ont une structure intermédiaire entre celles des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Comme les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes possèdent un réseau mycélien intercellulaire et un manteau (celui-ci est généralement peu épais). Comme dans le cas des endomycorhizes, les hyphes franchissent les parois des cellules-hôtes. Les ectendomycorhizes sont principalement produites par des champignons basidiomycètes.

Les ectendomycorhizes ont d'abord été considérées comme des infections d'importance mineure chez les conifères, apparaissant en l'absence de champignons ectomycorhiziens. En fait, ce type d'interaction est mutualiste et correspond souvent à une colonisation mycorhizienne précoce des plantules (Smith and Read, 1997).

2.1.3.1 Mycorhizes « arbutoïdes »

Les champignons formant ces types de mycorhizes peuvent former des ectomycorhizes sur d'autres plantes. Les mycorhizes « arbutoïdes » possèdent des similarités de structure avec les ectomycorhizes : elles présentent un manteau épais et un réseau de Hartig. Des complexes denses d'hyphes sont formés dans certaines cellules épidermiques (Smith and Read, 1997).

2.1.3.2 Mycorhizes monotropoïdes

Ces mycorhizes sont formées entre les végétaux appartenant aux Monotropacée (plantes non chlorophylliennes) et des basidiomycètes. Elles possèdent un manteau compact composé de plusieurs couches et un réseau de Hartig qui est présent uniquement au niveau des cellules épidermiques (Smith and Read, 1997).

3 Le Transport du Pi à travers les membranes

Le transport de solutés au travers d'une membrane peut être passif ou actif, en fonction qu'il nécessite ou non de l'énergie exigée par le processus. Le transport passif est un processus de diffusion dans lequel la direction du mouvement net est dictée par le gradient de concentration ou, dans le cas des ions par le gradient électrochimique. Un exemple de transport passif est la diffusion simple de petites molécules non polaires à travers la bicouche lipidique. La plupart des transports passifs ont cependant besoin de protéines de transport qui facilitent le passage des ions et molécules polaires à travers la partie interne hydrophobe de la membrane. On parle alors de diffusion facilitée. Le soluté diffuse toujours à travers la membrane dans la direction imposée par le gradient de concentration, mais son déplacement à l'intérieur de la membrane est facilité par une protéine de transport.

Ni la diffusion simple, ni la diffusion facilitée ne peut déplacer des solutés contre un gradient de concentration ou un gradient électrochimique. Le transport d'une substance contre son gradient électrochimique demande un apport d'énergie ce qui correspond à un transport actif. Les travaux pionniers d'Emmanuel Epstein (Epstein and Hagen, 1952; Epstein *et al.*, 1963) ont démontré que l'absorption des ions à travers une membrane suivent la cinétique de Michaelis-Menten comme les processus enzymatiques. L'application de ce formalisme, à l'analyse des cinétiques de transport des ions, a conduit à distinguer deux mécanismes selon l'affinité du transport. Les études de Drew *et al.* (1984) ont révélé que les cinétiques d'absorption de Pi chez les plantes sont généralement hyperboliques et monophasiques quand la concentration de Pi dans le milieu est basse (de l'ordre du μ molaire) et biphasique quand la concentration du milieu est élevée (de l'ordre du mmolaire), ce qui suggère que l'absorption du Pi est régulé par un transport à haute et à basse affinité. Ce type d'absorption biphasique a été observé chez les plantes (Clarkson and Lüttge, 1990), les bactéries (Rao and Torriani, 1990), les levures (Borst-Pauwels, 1981), et d'autres champignons (Burns and Beever, 1977), dont les hyphes qui proviennent de spores en germination de *Gigaspora margarita* (Thomson *et al.*, 1990). L'addition de Pi dans le milieu extérieur de cellules végétales provoque une dépolarisation de la membrane, suivie d'une repolarisation (Ullrich-

Eberius *et al.*, 1984; Sentenac and Grignon, 1985). La dépolarisation transitoire est interprétée comme l'indice de l'activité d'un système de symport $H^+ : Pi$ (ou d'antiport $OH^- : Pi$) non électriquement neutre et dépolarisant (entrée d'une charge positive nette ou sortie d'une charge négative nette).

La repolarisation serait la conséquence d'une accélération de l'ATPase pompe à protons en réponse à la dépolarisation de la membrane et/ou à la variation du pH cytoplasmique (Ullrich-Eberius, *et al.*, 1984; Thibaud *et al.*, 1988; Schachtman *et al.*, 1998; Sze *et al.*, 1999).

Le transport actif du Pi est nécessaire pour surmonter le gradient électrochimique résultant du potentiel négatif des membranes cellulaires (Leggewie *et al.*, 1997).

4 Transporteurs de Pi chez les plantes et les champignons

Arabidopsis a été utilisé comme modèle pour étudier la biologie des plantes depuis des nombreuses années et surtout après la publication de la séquence de son génome (The *Arabidopsis* initiative, 2000). La comparaison des processus de transport membranaire chez *Arabidopsis* et chez certains animaux, champignons et procaryotes, a permis l'identification d'environ 600 systèmes putatifs de transport membranaire chez cet organisme modèle.

Le transport de l'orthophosphate à travers les différentes membranes plasmalemmiques des plantes est assumé régulé par un certain nombre des familles de transporteurs. Un système de transport spécifique est essentiel pour l'absorption de Pi et sa distribution dans tous les tissus végétaux (Raghothama, 1999). Actuellement, il existent quatre familles connues de transporteurs de Pi : la famille Pht1 (membrane plasmalemmique), la famille Pht2 (membrane intérieur des plastides), la famille Pht3 (membrane intérieur de mitochondries) et la famille pPT (enveloppe intérieur des plastides) (Rausch and Bucher, 2002; Knappe *et al.*, 2003). Des études biochimiques ont démontré plusieurs activités de transport qui correspondent à des transporteurs de Pi supplémentaires, pas encore identifiés, qui participent à la distribution subcellulaire du Pi. Ces activités

comprennent l'influx du Pi au niveau vacuolaire (Massonneau *et al.*, 2000), l'efflux à partir des amyloplastes qui n'est pas directement couplé au transport des composés organiques phosphorylés (Neuhaus and Maass, 1996; Neckelmann and Orellana, 1998), et l'efflux à partir de l'appareil de Golgi où le Pi est généré comme un sous-produit de la glycosylation des protéines et des lipides (Neckelmann and Orellana, 1998). La recherche et caractérisation des transporteurs de Pi responsables de ces activités ou des activités inconnues actuellement sont nécessaires pour mieux comprendre comment les plantes régulent l'usage du Pi pour promouvoir leur croissance et leur développement (Guo *et al.*, 2007).

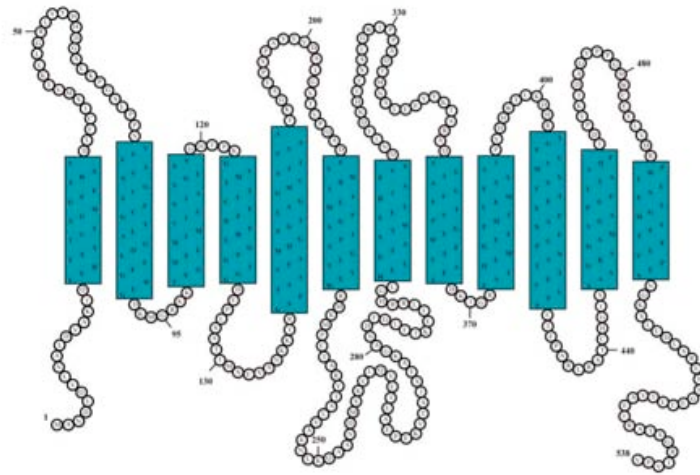


Figure 6a. Topologie prédite pour le transporteur de Pi (LePT1) chez la tomate Pht1;1 (Daram et al., 1998) typique des protéines de la famille Pht1, avec 12 domaines transmembranaires, des extrémités N-terminal et C-terminal cytoplasmiques et une longue boucle cytoplasmique entre les domaines transmembranaires 6 et 7. Les chiffres indiquent les acides aminés avec la méthionine marqué comme numéro 1. D'après (Poirier and Bucher, 2002).

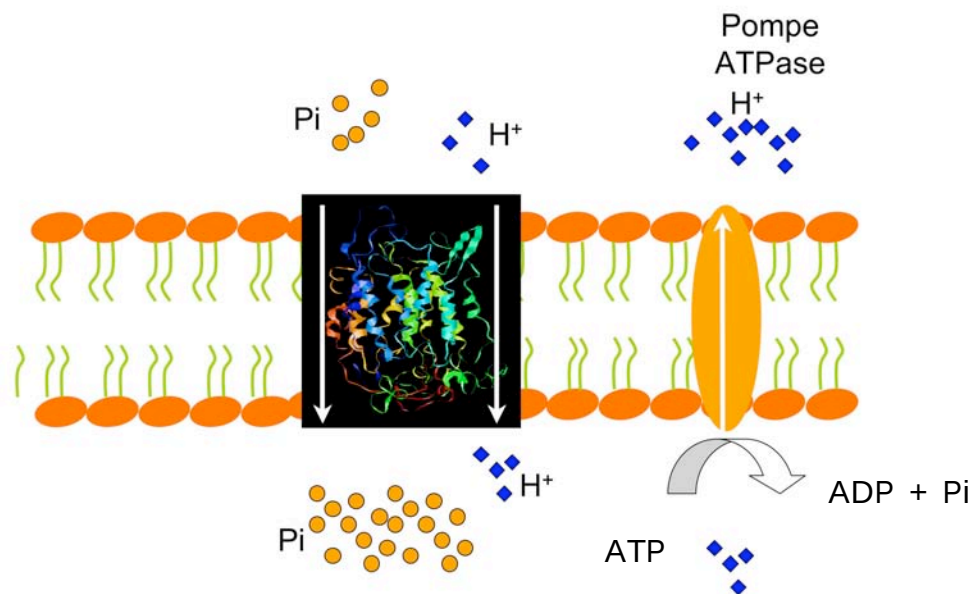


Figure 6b. Représentation d'un transporteur de Pi de la famille Pht1 au sein d'une membrane plasmalemmique. L'énergie nécessaire au système actif, est obtenue par une pompe ATPase qui forme un gradient de protons. Les protons sont transportés dans la même direction que le Pi à travers le transporteur.

4.1 Symports $\text{Pi}:\text{H}^+$

Plusieurs transporteurs de Pi symports ($\text{Pi}:\text{H}^+$ symporters) ont été identifiés chez les plantes (Laloi, 1999; Mudge *et al.*, 2002; Poirier and Bucher, 2002; Glassop *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006). Parmi ces transporteurs, les mieux décrits appartiennent à la famille Pht1. La famille Pht2 et Pht3 sont beaucoup moins connues.

4.1.1 Famille Pht1

Les transporteurs de Pi de la famille Pht1 (TC No. 2.A.1.9 ; (Saier, 2000) identifiés chez différents organismes présentent des degrés de similarité importants. Ils ont un poids moléculaire d'environ 60 kDa et une taille voisine de 550 acides aminés. Les analyses d'hydrophobicité montrent que ces transporteurs possèdent 12 segments transmembranaires. Les extrémités C et N-terminales de la protéine sont situées côté cytoplasmique. Les transporteurs végétaux et fongiques possèdent des sites conservés pour la phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II. Chez les transporteurs caractérisés comme des symports $\text{H}^+:\text{Pi}$, les domaines transmembranaires sont répartis en deux groupes de six séparés par une longue boucle centrale hydrophile (Smith *et al.*, 2000). La structure en 12 domaines transmembranaires est commune à des nombreux transporteurs ayant pour substrat des sucres, des ions, des antibiotiques ou des acides aminés. Ils appartiennent à la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily) (Marger and Saier, 1993) (Figure 6a et b).

L'expression de transporteurs appartenant à cette famille dans le système hétérologue de la levure, a montré une affinité modérée à haute pour le Pi (Tableau 1). Cependant, la majorité des K_M mesurés dans la levure sont supérieurs à 30 μM alors que les analyses cinétiques *in planta*, indiquent que le transport à forte affinité s'effectue avec un K_M compris entre 1 et 10 μM . Il est donc probable que la caractérisation en système hétérologue fournit une image altérée des performances réelles *in situ*, en particulier à cause de l'absence d'interaction avec les éventuelles protéines partenaires homologues (Leggewie, *et al.*, 1997; Daram, *et al.*, 1998; Guo, *et al.*, 2007). L'évaluation de la totalité de la famille Pht1 chez *A.thaliana*, a révélé une grande diversité des patrons d'expression à travers la plante. Ceci suggère une large participation de cette famille de

transporteurs de Pi au sein de la plante (Mudge, *et al.*, 2002). Parmi les neuf gènes de la famille Pht1 chez *Arabidopsis*, quatre sont exprimés dans l'épidermie des racines, ils ont donc peut-être un rôle dans l'absorption du Pi dans le sol.

Organism	Official nomenclature ^a	Other names ^b	Accession number	Expression pattern ^c	Apparent Km ^d	Reference ^e
<i>Neurospora crassa</i>		PHO5	AAA74899			1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		PHO84	P25297		8 μ M	2
<i>Glomus versiforme</i>		GvPT	AAC49132		18 μ M (yeast)	3
<i>Glomus intraradices</i>		GiPT	AAL37552			4
<i>Glomus mosseae</i>		GmosPT	AAZ22389			5
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LYCes:Pht1;1	LePT1	Q22548		31 μ M (yeast)	6, 7, 8, 9
<i>L. esculentum</i>	LYCes:Pht1;2	LePT2	Q22549			7, 9
<i>L. esculentum</i>	LYCes:Pht1;3	LePT3	Unpub.	AM +		9
<i>L. esculentum</i>	LYCes:Pht1;4	LePT4	AAX85192	AM S		9
<i>L. esculentum</i>	LYCes:Pht1;5	LePT5	AAX85194	AM +		9
<i>Solanum tuberosum</i>	SOLtu:Pht1;1	StPT1	CAA67395	AM -	280 μ M (yeast)	9, 10, 11
<i>S. tuberosum</i>	SOLtu:Pht1;2	StPT2	CAA67396	AM -	130 μ M (yeast)	9, 11
<i>S. tuberosum</i>	SOLtu:Pht1;3	StPT3	CAC87043	AM +	64 μ M (yeast)	9, 11, 12
<i>S. tuberosum</i>	SOLtu:Pht1;4	StPT4	AAW51149	AM S		9
<i>S. tuberosum</i>	SOLtu:Pht1;5	StPT5	AAX85195	AM S		9
<i>Medicago truncatula</i>	MEDtr:Pht1;1	MiPT1	AAB81346	AM -	192 μ M (yeast)	13, 14
<i>M. truncatula</i>	MEDtr:Pht1;2	MiPT2	AAB81347	AM -		13, 14
<i>M. truncatula</i>	MEDtr:Pht1;4	MiPT4	AAM76744	AM S	493–668 μ M (yeast)	12, 14
<i>Lotus japonicus</i>	LOTja:Pht1;1	LjPT1	BAE93351	AM -		15
<i>L. japonicus</i>	LOTja:Pht1;2	LjPT2	BAE93352	AM -		15
<i>L. japonicus</i>	LOTja:Pht1;3	LjPT3	BAE93353	AM +		15
<i>Oryza sativa</i>	ORYsa:Pht1;1	OSPT1	AAN39042	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;2	OSPT2	AAN39043	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;3	OSPT3	AAN39044	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;4	OSPT4	AAN39045			16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;5	OSPT5	AAN39046			16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;6	OSPT6	AAN39047	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;7	OSPT7	AAN39048			16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;8	OSPT8	AAN39049			16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;9	OSPT9	AAN39050	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;10	OSPT10	AAN39051	AM -		16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;11	OSPT11	AAN39052	AM S		16, 17
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;12	OSPT12	AAN39053			16
<i>O. sativa</i>	ORYsa:Pht1;13	OSPT13	AAN39054	AM +		16, 17
<i>Hordeum vulgare</i>	HORvu:Pht1;1	HvPT1	AAN37900	AM -	9 μ M (rice cells)	18, 19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;2	HvPT2	AAO72433	AM -		18, 19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;3	HvPT3	AAO72439			18, 19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;4		AAO72437			19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;5		AAO72435			19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;6		AAN37901		385 μ M (rice cells)	19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;7		AAO72436			19, 20
<i>H. vulgare</i>	HORvu:Pht1;8		AAO72440	AM +		19, 20
<i>Triticum aestivum</i>	TRIae:Pht1.myc		CAH25730	AM S		20
<i>Zea mays</i>	ZEAm:Pht1;1	ZmPT2	AAY42385	AM -		21, 22
<i>Z. mays</i>	ZEAm:Pht1;2		AAY42386			22
<i>Z. mays</i>	ZEAm:Pht1;3		AAY42387			22
<i>Z. mays</i>	ZEAm:Pht1;4	ZmPT1	AAY42388	AM -		21, 22
<i>Z. mays</i>	ZEAm:Pht1;5		AAY42389			22
<i>Z. mays</i>	ZEAm:Pht1;6		CAH25731	AM +		20, 22
<i>Z. mays</i>	^f	ZmPT3	AAT51692	AM -		21

^aName of plant Pi transporters according to the official nomenclature (Karandashov & Bucher 2005).

^bName of plant Pi transporters as indicated in the original references.

^cExpression pattern of plant Pi transporters in response to AM symbiosis: mycorrhiza specific (AM S), up-regulated (AM+) or down-regulated (AM-).

^dThe method used to determine the apparent Km is indicated between brackets and refers to heterologous expression in yeast (yeast) or rice cell culture (rice cells).

^eReferences: 1: (Versaw 1995); 2: (Bun-ya *et al.* 1991); 3: (Harrison & van Buuren 1995); 4: (Maldonado-Mendoza *et al.* 2001); 5: (Benedetto *et al.* 2005); 6: (Daram *et al.* 1998); 7: (Liu *et al.* 1998a); 8: (Rosewarne *et al.* 1999); 9: (Nagy *et al.* 2005); 10: (Leggiewe *et al.* 1997); 11: (Rausch *et al.* 2001); 12: (Karandashov *et al.* 2004); 13: (Liu *et al.* 1998b); 14: (Harrison *et al.* 2002); 15: (Maeda *et al.* 2006); 16: (Paszowski *et al.* 2002); 17: (Guimil *et al.* 2005); 18: (Smith *et al.* 1999); 19: (Rae *et al.* 2003); 20: (Glassop *et al.* 2005); 21: (Wright *et al.* 2005); 22: (Nagy *et al.* 2006).

^fThis gene was not yet assigned a name following the official nomenclature.

Tableau 1. Patron d'expression et d'affinité de certains transporteurs de Pi fongiques et végétaux. D'après (Javot *et al.*, 2007)

Une insertion de type T-DNA dans deux de ces gènes (ARATH;Pht1;1 et ARATH;Pht1;4) a démontré l'importance de leur rôle dans l'absorption du Pi. Le double mutante (pht1;4) a une capacité réduite d'absorption du Pi dans des conditions de forte et faible teneur en Pi. La perte de l'activité de Pht1;1 et Pht1;4 entraîne une augmentation de l'élongation des poils absorbants et des racines latérales, une réduction dans la teneur en Pi dans les tiges et une accumulation d'anthocyanines (Shin *et al.*, 2004). Ceci montre l'évidence du rôle clé des protéines de la famille Pht1 dans l'absorption du Pi et donc dans la régulation de la réponse à la carence en Pi via le contrôle de l'homéostasie du phosphore chez la plante (Bucher, 2007).

4.1.2 Famille Pht2

Les transporteurs symports localisés au niveau des plastides font partie de la famille Pht2. Malgré la similitude de leurs séquences avec les transporteurs symports $\text{Pi}:\text{Na}^+$ de *Neurospora crassa* (PHO4) et *S. cerevisiae* (PHO89), tous les membres caractérisés de cette famille réalisent uniquement un transport de type $\text{Pi}:\text{H}^+$ chez la levure (Versaw and Harrison, 2002; Mann *et al.*, 1989; Daram *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004).

Le premier membre de la famille Pht2 des transporteurs de Pi, a été caractérisé (ARATH;Pht2;1) par Daram *et al.*, 1999. L'ADNc de Pht2;1 code une protéine de 61-kD qui possède une structure similaire mais différente des protéines de la famille Pht1. Pht2;1 a un long boucle hydrophilique entre les domaines transmembranaires 8 et 9 et une longue extension N-terminale. Pht2;1 se différencie des membres connus de la famille Pht1 en principalement trois aspects : structure primaire, affinité pour le Pi (basse affinité), localisation subcellulaire (chloroplaste). Ceci suggère fortement que la fonction des membres des deux familles n'est pas la même.

4.1.3 Famille Pht3

La famille Pht3 a été décrite chez Arabidopsis. Les gènes de cette famille codent une petite famille de transporteurs de Pi mitochondriaux. Trois membres ont été découverts chez Arabidopsis : Pht3;1 (NCBI accession number BAB08283; (Nakamura *et al.*, 1997), Pht3;2 (PIR entry T49281), et Pht3;3 (PIR entry B84550).

Ces trois gènes codent des protéines de 309 à 375 acides aminés et elles contiennent de 4 à 6 hélices transmembranaires. Les gènes de la famille Pht3 montrent une forte homologie avec le premier translocateur de Pi mitochondrial cloné chez *Betula pendula* (Kiiskinen *et al.*, 1997).

Symports $\text{Na}^+:\text{Pi}$

Les transporteurs de Pi identifiés chez les vertébrés sont des symports $\text{Na}^+:\text{Pi}$. Il en existe trois types : le type I dont le rôle est inconnu, le type II qui participe au contrôle de l'homéostasie du P au niveau des cellules épithéliales chez les mammifères et le type III qui correspondrait aux transporteurs dites « de ménage ».

Les transporteurs de type II ont une expression constitutive. Ils ont été identifiés chez de nombreuses espèces animales : homme, souris, bœuf... Ils possèdent 11 segments transmembranaires potentiels. Les transporteurs de type III sont homologues des systèmes à basse affinité de *Escherichia coli* (système Pit, Cf. § VI.4.) et de ScPHO89 de *S.cerevisiae* (Cf. § VI.5.1.). Le niveau d'expression et l'activité de ces transporteurs sont régulés par le niveau de Pi extracellulaire (Werner and Kinne, 2001).

4.1.4 Famille PHT4

Récemment la famille PHT4 a été découverte chez *Arabidopsis* grâce à la publication de son génome. Elle comprend six membres et les études ont suggéré que leur rôle est le transport du Pi entre le cytosol et les chloroplastes, d'autres plastes non photosynthétiques et l'appareil de Golgi. Leur structure est similaire aux transporteurs de Pi type I de mammifères (solute carrier family SLC17, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>). Les six membres de cette famille, ont été caractérisés par le système hétérologue de la levure (Guo, *et al.*, 2007).

4.2 Antiporteurs/ translocateurs de Pi

Les données du séquençage du génome d'*Arabidopsis* suggèrent que les mitochondries végétales possèdent une autre classe de protéines porteuses « carriers » capables de transporter le Pi que les familles des transporteurs de Pi mentionnées ci-dessus. Des homologues des « dicarboxylate carriers (DIC) » chez les plantes ont été identifiés, mais il manque encore une preuve directe de leur activité. Chez les animaux, les DICs catalysent l'échange entre le Pi et des dicarboxylates comme le malate, succinate et

malonate (Laloi, 1999; Picault *et al.*, 2004). De nouvelles données seront nécessaires pour confirmer les propriétés des DICs chez les plantes.

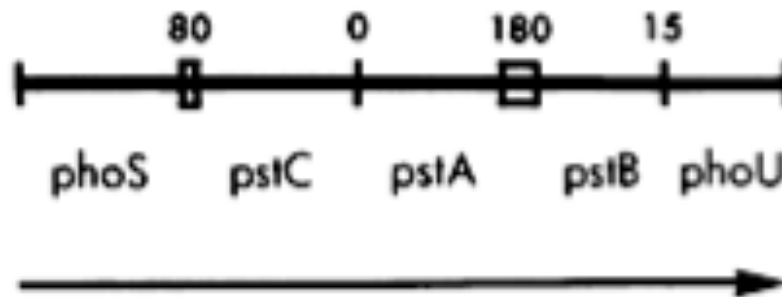


Figure 7. Structure des composant du système Pst chez *E.coli*, dans le plasmide pAN92. La flèche indique le sens de la transcription. Les lignes verticales tracent l'ampleur des gènes représentés et les chiffres et les carrés indiquent la taille des régions intergéniques (paire de bases). Source : (Surin *et al.*, 1985).

5 Transporteurs bactériens

Il existe deux systèmes de transport de Pi chez les bactéries, selon les espèces, elles peuvent posséder un ou deux systèmes. Quand les deux systèmes sont présents, on distingue généralement un système à faible affinité (LATS) exprimé de façon constitutive et le deuxième correspond à un système à forte affinité (HATS) réprimé lorsque le Pi est disponible. Quand le Pi ne constitue pas un facteur limitant, le transport du Pi est effectué par le système constitutif LATS. Ce type de système possède un K_M faible (environ 20 μM) et donc une affinité semblable à celle des systèmes à haute affinité caractérisés chez les plantes et les champignons.

Chez *E.coli*, le système à haute affinité est appelé Pst et celui qui est à faible affinité : Pit. Le système Pst est un système de transport à haute affinité spécifique, inductible et possédant un K_M d'environ 0,2 μM . le système Pit est constitutif alors que le système Pst est réprimé par des concentrations de Pi supérieures à 10^{-3} M. Mise à part son rôle dans le transport du Pi, le système Pst joue un rôle important dans la régulation d'un certain nombre des gènes coordonnés, qui sont aussi réprimés par le phosphate et dont le plus connu est *phoA*, un gène codant une phosphatase alcaline (Bachmann, 1983). Les composants du système Pst sont codés par cinq gènes qui sont induits de façon coordonnée par la limitation en Pi (c'est le régulon Pho) : il s'agit des gènes *PhoS*, *PstC*, *PstA*, *PstB* et *PhoU* (Figure 7). La partie transmembranaire du transporteur est constituée de *PstA* et *PstC*. *PstS* est une « binding-protein » affine de Pi situé dans le périplasme. *PhoU* et *PstB* sont des protéines membranaires périphériques dont le rôle exact est inconnu. Elles pourraient être impliquées dans le système Pst ou avoir un rôle dans l'interaction de ce système avec le régulon Pho (Surin, *et al.*, 1985).

6 Transporteurs de Pi des levures

Saccharomyces cerevisiae est le modèle pour les études de transport chez les levures. Dans cet organisme, on retrouve une composante constitutive à faible affinité pour le Pi (de l'ordre du mM) et une inductible à haute affinité (de l'ordre du μM). Il s'agit d'un mécanisme de symport $\text{H}^+:\text{Pi}$ dont le K_M est de 1 mM à pH 4,5 pour la composante à basse affinité et un K_M compris entre 1 et 15 $\mu\text{mol/l}$ pour celle qui est à haute affinité.

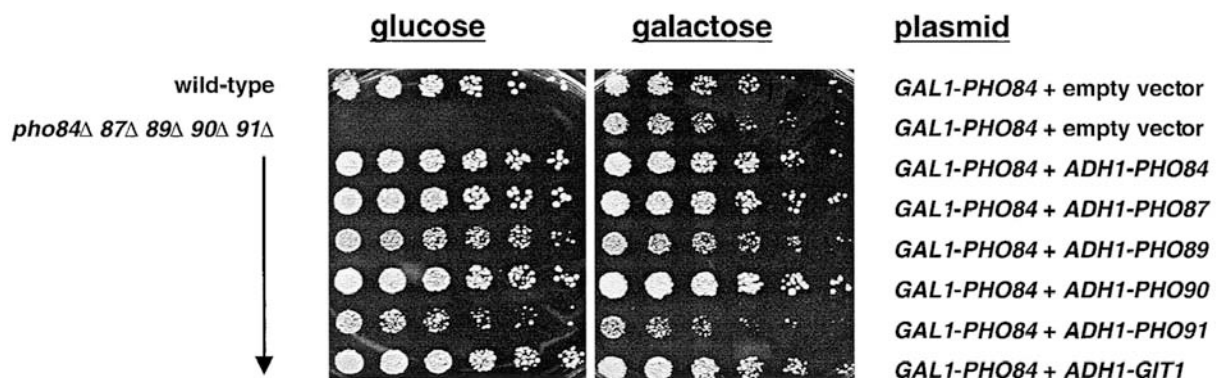


Figure 8. Létalité synthétique de la souche *pho84Δ pho89Δ pho90Δ pho91Δ*. La ligne 1 correspond à la souche sauvage (EY57), la ligne 2 est la souche avec la délétion des cinq transporteurs (EY917), et les lignes 3-8 correspondent à EY917 qui contient différentes constructions de surexpression. Toutes ces souches contiennent aussi le vector EB1280 (pGAL1-PHO84). Source : (Wykoff and O'Shea, 2001).

Les premiers transporteurs de Pi identifiés chez la levure son ScPHO84 (Bun-Ya *et al.*, 1991) et ScPHO89 (Martinez and Persson, 1998). En total, cinq transporteurs de Pi ont été identifiés chez la levure (Wykoff and O'Shea, 2001). Il s'agit de ScPHO84, ScPHO89, ScPHO87 (système de transport impliqué dans la composante à haute affinité) et ScPHO90 et ScPHO91 (système de transport impliqué dans la composante à basse affinité). Les levures dans lesquelles ces cinq gènes sont inactivés meurent quelle que soit la concentration de Pi disponible dans le milieu (Figure 8). Les deux transporteurs à haute affinité, ScPHO84 et ScPHO89, pourraient fonctionner de façon complémentaire puisque leurs pH optimaux sont éloignés. Les autres transporteurs de Pi (ScPHO87, ScPHO90 et ScPHO91) sont responsables d'une faible proportion de l'absorption totale. Les deux systèmes de transport de Pi à forte affinité de *S.cerevisiae* sont régulés par la voie PHO qui contrôle également les gènes des phosphatases. La voie PHO contrôle aussi de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du Pi. ScPHO87 intervient surtout en tant que « senseur de P » et sa contribution à l'absorption est faible. ScPHO84 est le transporteur majoritaire, il intervient également dans une moindre mesure en tant que « senseur de P » (Wykoff and O'Shea, 2001).

7 Transporteurs de Pi des champignons filamenteux non mycorhiziens

Deux champignons filamenteux ont été sujets à des études sur le transport du Pi, principalement : *Neurospora crassa* et *Pholiota nameko*.

N. crassa est connu pour son utilisation comme organisme modèle en science puisqu'il pousse facilement et a un cycle de vie haploïde, ce qui simplifie l'analyse génétique vu que les traits récessifs se manifesteront dans la descendance. Dans son environnement naturel, *N. crassa* vit surtout en région tropicale et subtropicale. On peut en trouver croissant sur du matériel végétal mort après un incendie. Dans son édition du 24 avril 2003, la revue *Nature* annonçait que le génome de *N. crassa* était complètement séquencé. Le génome a une longueur d'environ 43 mégabases et comporte environ 10 000 gènes (Galagan *et al.*, 2003).. Comme la plupart des organismes, *N.crassa* possède deux mécanismes d'absorption de Pi (Beever and Burns, 1977) : un premier mécanisme constitutif à faible affinité et un second inductible à haute affinité. Les études ont montré que le second mécanisme implique l'activité de deux transporteurs non

homologues de Pi à haute affinité. Il s'agit de *NcPHO-4* (Mann, *et al.*, 1989) et *NcPHO-5* (Versaw and Harrison, 2002). *NcPHO-4* est un symport

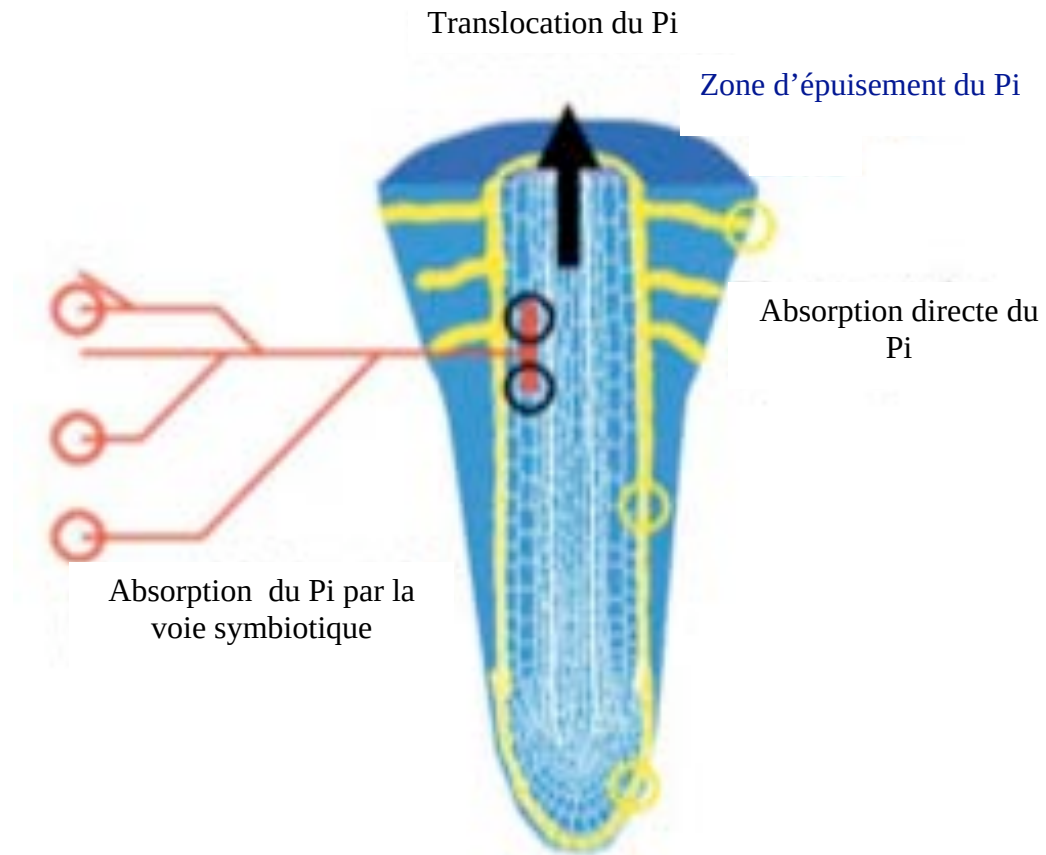


Figure 9. Représentation des deux voies d'absorption du Pi dans une racine endomycorhizée. Dans la voie directe, les transporteurs de Pi chez la plante (cercles jaunes) localisés dans l'épidermis, ont le rôle de l'absorption du Pi du sol directement dans les cellules racinaires. Le taux d'absorption est supérieur au taux de diffusion du Pi, ce qui favorise la formation d'une zone d'épuisement (zone bleue) proche de la surface racinaire, ce qui limite le taux d'absorption du Pi direct. L'absorption du Pi par la voie symbiotique implique l'absorption de ce dernier par les transporteurs de Pi fongiques (cercles rouges) localisés chez les hyphes extramatrixelles. Le Pi est ensuite transféré vers la racine et éventuellement à l'interface symbiotique dans le cortex. Les transporteurs Pht1 chez la plante, localisés dans cette interface (cercles noirs) sont

impliqués dans l'absorption de Pi dans les cellules corticales.

Na⁺:Pi de 590 acides aminés, présentant 12 segments transmembranaires séparés en deux groupes par une boucle hydrophile située entre les segments 8 et 9, son K_M est de 2,56 μM. NcPHO-5 est un symport H⁺:Pi de 569 acides aminés. Ce transporteur possède la structure caractéristique des membres de la MFS comme la famille Pht1. Ces deux transporteurs non homologues ont des rôles distincts dans l'acquisition du Pi. NcPHO-4 serait responsable de la quasi-totalité de l'absorption du Pi lorsque le pH est supérieur ou égal à 8. NcPHO-5 interviendrait dans l'absorption de Pi lorsque les concentrations sont faibles et le pH proche de la neutralité ou acide. L'absence de l'un de ces deux transporteurs n'affecte pas le niveau de dérégulation de l'autre (Versaw and Metzenberg, 1995). NcPHO-4 a une affinité pour le Pi supérieur à celle de NcPHO-5, mais discrimine moins entre le phosphate et ses analogues (Versaw and Harrison, 2002).

8 Absorption du Pi chez les champignons AM

La symbiose AM est accompagnée d'une réorganisation dramatique des flux de Pi chez la plante, mais aussi d'autres ajustements cellulaires sont nécessaires pour permettre une colonisation réussie de la racine par le champignon (Javot, *et al.*, 2007). Pendant la colonisation du champignon, les hyphes fongiques pénètrent les cellules corticales de la racine, et à l'intérieur de ces cellules, les hyphes du champignon se différencient pour former une structure hautement ramifiée (Figure 5b). L'arbuscule peut remplir la majorité du cytoplasme cellulaire, mais ceci ne compromet pas l'intégrité de la membrane plasmalemmique de la cellule corticale de la plante. Les plantes répondent à l'invasion en enveloppant l'arbuscule avec une membrane spécialisée appelée « membrane periarbusculaire ». La grande interface générée entre la membrane de l'arbuscule et la membrane periarbusculaire est supposée d'être le lieu d'échange des solutés entre les deux symbiontes (Javot, *et al.*, 2007). Le transfert de Pi depuis le champignon vers la plante a été démontré dans un système de pots compartimentés via l'utilisation des sources de Pi marqué avec du ³²P- ou ³³P qui étaient uniquement accessibles au champignon (Jakobsen, *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Ce type de système a permis de démontrer que la contribution du champignon à l'acquisition du Pi chez la plante varie par rapport à la combinaison des partenaires

fongiques et végétaux. L'apport pouvait être très réduit ou il pouvait comprendre la quasi-totalité du Pi absorbé par la plante. Il a été aussi démontré que même en présence de Pi en contact avec le système racinaire, les plantes obtenaient un pourcentage de Pi provenant du champignon (Jakobsen, *et al.*, 1992; Smith, *et al.*, 2003; Smith, *et al.*, 2004). Les protéines potentiellement impliquées dans le transport de Pi symbiotique ont été identifiées chez certains champignons. Les champignons AM possèdent des transporteurs à haute affinité du type Pi:H^+ symport, qui sont homologues au transporteur PHO84 de la levure et ils appartiennent à la famille Pht1 (Harrison and van Buuren, 1995; Pao *et al.*, 1998). Les trois transporteurs identifiés actuellement (*GvPT*, *GiPT*, *GmosPT* de *Glomus versiforme*, *G.intraradices* et *G. mosseae*, respectivement) sont exprimés chez les hyphes extramatricielles, mais *GmosPT* montre aussi une expression significative dans les hyphes intraracinaires. Une fois que le Pi est entré dans le cytoplasme fongique, il s'accumule rapidement dans la vacuole (Solaiman *et al.*, 1999; Ezawa *et al.*, 2001). Récemment, des études ont démontré que quand un champignon est transféré d'une source dépourvue de Pi à une source riche en Pi, le Pi est accumulé et transformé rapidement (moins de 3 heures) en grande quantité de polyphosphate (poly-P) (Ezawa *et al.*, 2003). Les poly-P sont omniprésentes et remplissent plusieurs fonctions qui vont du stockage du Pi jusqu'à l'amélioration de la fidélité de la traduction (Kornberg *et al.*, 1999). Malgré les nombreuses fonctions attribuées aux poly-P, seulement le stockage et la translocation du Pi ont été étudiés chez les champignons AM. Les poly-P accumulés dans le compartiment vacuolaire peuvent être transférés des hyphes extramatricielles aux hyphes intramatricielles probablement via des mouvements cytoplasmiques (cytoplasmic streaming) et/ou via un système tubulaire motile de vacuoles (Cooper and Tinker, 1981; Smith and Read, 1997). Des phosphatases pourraient être responsables de la lyse de la chaîne de Poly-P pour libérer le Pi dans les hyphes intramatricielles. Une fois que le Pi a été libéré dans les hyphes intramatricielles, il est supposé qu'il est transféré au compartiment apoplastique periarbusculaire par un mécanisme inconnu. A partir de ce compartiment, le Pi est accessible à la plante. Cette nouvelle source de Pi présente dans les cellules corticales de la racine est accompagnée par des nombreux re-arrangements dans le transport de Pi chez la plante (Javot, *et al.*, 2007).

8.1 Gènes de la famille *Pht1* chez les plantes impliquées dans la symbiose AM et la conservation évolutive de leur régulation

Les plantes modèles employées pour ce type d'étude sont des légumineuses comme *M.truncatula* et *L.japonicus* et des solanacées qui peuvent établir des symbioses AM en conditions naturelles et peuvent donc être utilisées comme systèmes expérimentaux.

A. thaliana, le modèle végétal utilisé de façon universelle pour des études génétiques, ne forme pas de mycorhize, il donc pas approprié pour ce genre de recherches (Bucher, 2007).

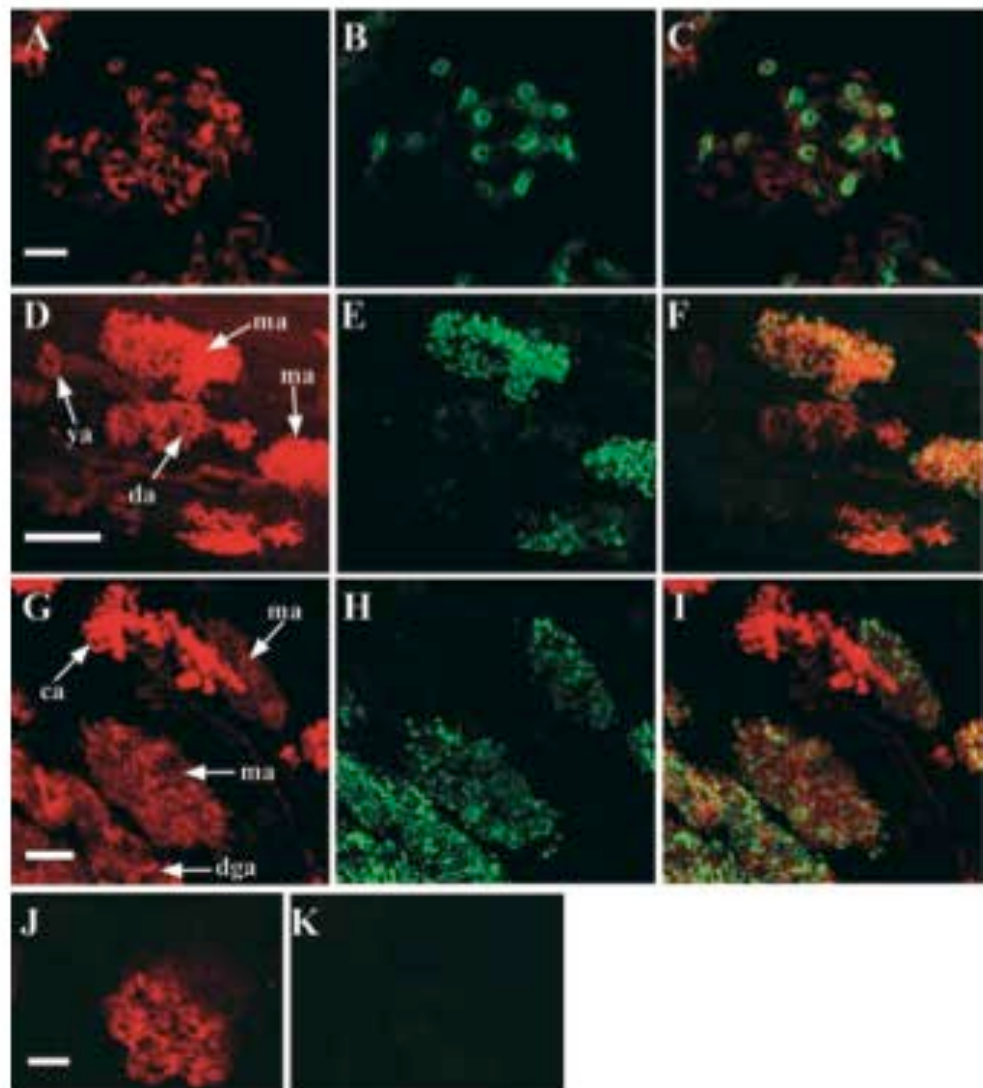


Figure 10. Images prises par microscopie confocal laser des racines mycorhizées de *M.truncatula*/*G.versiforme* en présence des anticorps anti-MtPT4.

(A), (D), (G) et (J) fluorescence rouge avec le fluorochrome WGA-Texas red qui met en évidence le champignon

(B), (E) et (H) images qui montrent la fluorescence verte de l'immunolocalisation de MtPT4

(C), (F) et (I) images superposées de la fluorescence rouge et verte.

(K) sérum pré-immun

(A) à (C) section optique unique à travers les branches d'un arbuscules ; barre= 10 mm. (D) à (F) projections de 18 sections optiques prises à des intervalles de 0,4- μ m. Les signaux de MtPT4 n'ont pas été détectés autour des très jeunes arbuscules (ya). Les signaux de MtPT4 sont uniquement détectés autour des arbuscules en développement (da). Les arbuscules matures (ma) dans la même région de la racine montrent une forte coloration verte. Bar= 50 mm. (G) à (I) projections de 22 sections optiques prises à des

intervalles de 0,3 μm . les arbuscules sénescents (ca) n'ont pas montré de signaux. (J) et (K) projections de 15 sections optiques prise à des intervalles de 0,5 μm . le sérum pré-immun n'a pas montré de fluorescence. Source : (Harrison *et al.*, 2002).

En général, le niveau des transcrits de la majorité des transporteurs de Pi appartenant à la famille Pht1 diminue avec l'augmentation de la teneur de Pi dans le milieu, y compris pendant la symbiose AM. Cependant, il existe un groupe réduit de transporteurs de type Pht1 qui sont stimulés par les niveaux faibles en Pi mais surtout dans les racines mycorhizées. Des membres de la famille Pht1 qui sont exprimés spécifiquement pendant la symbiose AM ont été identifiés chez plusieurs espèces.

Le point de départ de l'analyse détaillée du transport de Pi dans l'interface symbiotique chez les solanacées est constitué par la découverte du gène codant un transporteur de Pi chez la pomme de terre, *StPT3* (SOLtu;Pht1;3) (Rausch *et al.*, 2001). *StPT3* fait partie des gènes qui sont fortement induits par la symbiose AM, mais il présente tout de même, une expression basale dans des racines non colonisées (Tableau 1). D'autres gènes découverts jusqu'à maintenant avec ce profil d'expression sont : LOTja;Pht1;3 chez *L. japonicus* (Maeda *et al.*, 2006); ORYsa;Pht1;13 chez le riz (Guimil *et al.*, 2005); HORvu;Pht1;8 chez l'orge (Glassop, *et al.*, 2005) et ZEAm;Pht1;6 chez le maïs (Nagy, *et al.*, 2006). *StPt3* et ZEAm;Pht1;6 ont été aussi détectés chez la tige à des niveaux faibles (Nagy, *et al.*, 2005; Nagy, *et al.*, 2006).

Il existe une autre catégorie de gènes des transporteurs de Pi qui sont strictement induits en réponse à la symbiose AM. Ils ont été découverts dans les espèces suivantes : *Medicago truncatula* (MEDtr;Pht1;4 : (Harrison, *et al.*, 2002) ; le riz (ORYsa;Pht1;11 : (Paszkowski *et al.*, 2002) ; la pomme de terre (SOLtu;Pht1;4 et SOLtu;Pht1;5 : (Nagy, *et al.*, 2005) ; le blé (TRIAe;Pht1;myc : (Glassop, *et al.*, 2005) et la tomate (LYCes;Pht1;4 : (Nagy, *et al.*, 2005).

La protéine MEDtr;Pht1;4 de *M.truncatula*, a été détecté par immunolocalisation au niveau de la membrane périarbusculaire entourant les branches fines des arbuscules matures (Figure 10). Le signal était absent dans la région qui entoure le tronc de l'arbuscule. Le fait que le signal était uniquement présent dans des arbuscules matures,

renforce l'idée que ces derniers, pourrait être le site majeur d'échange de P_i entre les deux symbiontes (Harrison, *et al.*, 2002). Ce modèle d'expression corrobore des résultats précédents suggérant le transport actif intense dans la membrane periarbusculaire : les ATPases membranaires sont très abondantes autour des branches fines des arbuscules et elles disparaissent dans les arbuscules sénescents (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000).

Des résultats d'une autre étude, concernant une mutante de tomate (*rmc*) avec une capacité réduite de colonisation *mycorhizienne*, ont démontré que les arbuscules jouent un rôle crucial dans l'absorption de Pi. L'établissement de la symbiose et donc l'expression des transporteurs de Pi induits par la mycorhization dans des cellules qui contiennent les arbuscules, est souvent accompagné de la répression d'autres transporteurs de Pi du type Pht1, en particulier, ceux qui sont localisés dans l'épidermie (Tableau 1). Cette répression de certains transporteurs a été observée chez : la pomme de terre (SOLtu;Pht1;1 et 2 : (Rausch, *et al.*, 2001) ; *M. truncatula* (MEDtr;Pht1;1 et 2 : (Liu *et al.*, 1998) : *L. japonicus* (LOTja;Pht1;1 et 2 (Maeda, *et al.*, 2006); le riz (ORYsa;Pht1;1,2,3,6,9 et 10 (Paszkowski, *et al.*, 2002); l'orge (HORvu;Pht1;1 et 2 (Glassop, *et al.*, 2005) et le maïs (ZEAm;Pht1;1 et 4 (Wright *et al.*, 2005). Ces résultats démontrent l'équilibre fin maintenu entre les voies d'absorption de Pi fongiques et racinaires.

9 Transport de Pi chez les champignons ectomycorhiziens

Jusqu'à récemment, l'essentiel des données disponibles provenait uniquement d'approches cinétiques classiques. Des études réalisées sur des mycorhizes excisées (*Picea sitchensis*/*Tylospora fibrillosa*) montrent que les mycorhizes jeunes présentent une cinétique d'absorption biphasique interprétée comme résultant de la présence de deux systèmes de transport : un système à haute affinité et un système à faible affinité. Ce type d'absorption biphasique a également été observé chez des ectomycorhizes de *Fagus sylvatica* et *Pinus radiata*. Chez les mycorhizes les plus âgées, les analyses cinétiques montrent qu'il n'y aurait plus que le système de transport à haute affinité (Cairney and Alexander, 1992).

Lorsque la concentration de Pi dans le milieu est faible et après induction du transport à forte affinité, les plantes de *Pinus sylvestris* non mycorhizées prélèvent cet ion avec un K_M compris entre 7 et 17 μM . Chez les plantes mycorhizées avec *Paxillus involutus*, *Suillus bovinus* ou *Thelephora terrestris*, le prélèvement s'effectue avec un K_M compris respectivement dans les gammes de concentrations 2-8 μM , 5-13 μM et 4-11 μM . Les trois champignons ont un fort impact sur la capacité d'absorption de Pi bien que les

paramètres cinétiques des différents systèmes mycorhizés soient relativement hétérogènes (Van Tichelen and Colpaert, 2000). Les analyses de Kothe *et al.*, (2002) ont révélé l'existence d'homologues de *NcPHO-5* chez *Tricholoma vaccinum* et de *NcPHO-4* chez *Tricholoma terreum*. L'homologue de *NcPHO-5* est exprimé uniquement à des teneurs faibles de Pi (5 μ M). L'expression de l'homologue de *NcPHO-4* est cinq fois plus importante à faible qu'à forte concentration de Pi (5 et 100 μ M). l'homologue de *NcPHO-4* serait donc responsable, au moins en partie, de l'absorption «à faible affinité».

Un ensemble de travaux récents, conduits en particulier par l'équipe de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes de l'UMR 5004 à Montpellier, ont conduit à l'identification de deux systèmes de transport de Pi chez le basidiomycète *Hebeloma cylindrosporum* : *HcPT1* et *HcPT2* (Tatry, 2003).

Les séquences des gènes *HcPT1* et *HcPT2* présentent les caractéristiques typiques des symports H^+ :Pi déjà identifiés chez les champignons et les végétaux : une taille classique d'environ 550 acides aminés et douze domaines transmembranaires disposés en deux groupes de six séparés par une boucle intracellulaire. Ces deux gènes sont proches du système de symport H^+ :Pi *ScPHO84* de *S. cerevisiae*, ce qui constitue un résultat original comparé aux données déjà disponibles chez les champignons. L'analyse d'expression de *HcPT1* dans les travaux de thèse de MV. Tatry en 2003 ont conduit à inférer le rôle de ce gène dans l'absorption de Pi à partir du sol. En effet, *HcPT1* répond fortement aux variations de la disponibilité de Pi dans le milieu, avec une expression qui augmente rapidement en cas de carence en Pi, et diminue fortement dans le cas d'un apport de Pi (Tatry *et al.*, 2008). Ceci a été confirmé ultérieurement par RT-PCR *in situ*, cette étude a démontré que non seulement *HcPT1* est surexprimé en cas de carence en Pi mais aussi qu'une plus grande partie du mycélium est impliqué dans l'acquisition du Pi (van Aarle *et al.*, 2007) .

En ce qui concerne *HcPT2*, il a été démontré qu'il est fortement exprimé dans les mycorhizes, et cette expression est favorisée par la présence de Pi dans le milieu. Ces deux transporteurs ont présenté des cinétiques d'absorption de Pi très différentes dans le système hétérologue de la levure. *HcPT1* peut être classé comme un transporteur de Pi à

affinité modéré (K_M de 55 μM), alors qu'HcPT2 serait le transporteur de Pi avec la plus forte affinité mesuré jusqu'à maintenant (K_M de 4 μM). L'identification des deux transporteurs de Pi chez *H. cylindrosporum* avec des cinétiques d'absorption de Pi et patrons d'expression très contrastés pourrait correspondre à une redondance fonctionnelle au niveau des hyphes (Tatry, *et al.*, 2008).

10 Conclusions des éléments bibliographiques

De cette analyse bibliographique, il est nécessaire de souligner plusieurs points importants. La gestion de la forêt nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui déterminent et modifient la fertilité du sol. Le phosphore est un de ces nutriments et est utilisé par les arbres sous la forme d'orthophosphate (Pi), qui est l'un des facteurs limitant la production forestière.

Les essences ligneuses ont dû développer un ensemble de mécanismes adaptatifs conduisant à une utilisation plus efficace des nutriments. Une adaptation majeure développée par les arbres est la symbiose mycorhizienne. Cette association, entre les racines des arbres et un champignon conduit notamment à une amélioration de la nutrition phosphatée. Premièrement, la symbiose mycorhizienne (endo et ectomycorhizienne principalement) est un déterminant majeur de la productivité des écosystèmes forestiers où des pratiques de fertilisation sont peu envisageables.

Les travaux menés à ce jour sur les ectomycorhizes et les endomycorhizes favorisent l'hypothèse selon laquelle la stimulation de la nutrition phosphatée de la plante-hôte résulte aussi de la capacité des champignons associés à accumuler de grandes quantités de phosphore. Cependant, eu égard à l'importance biologique de ce phénomène, nos connaissances sur les déterminants moléculaires responsables de la mobilisation et du prélèvement de Pi par le champignon (voie symbiotique) et les racines des arbres (voie non-symbiotique), sont très réduites. La plupart des travaux menés à nos jours, ce sont focalisés sur des espèces non ligneuses (*Arabidopsis*, *M. truncatula*, *O.sativa*, *H.vulgare*, *L. japonicus*, *T. vulgare*, *Z. mays*). Ceci exclu les données liées aux arbres qui possèdent aussi une forte importance économique et écologique que les espèces agricoles. Pendant longtemps, les endomycorhizes ont été le modèle de symbiose étudié chez ces espèces non pérennes. Donc, on connaît peu sur la symbiose ectomycorhizienne en ce qui concerne le transport de Pi au niveau moléculaire.

Le peuplier est le modèle idéal de nos études pour plusieurs raisons : la publication de son génome, sa capacité à former des endo- et ectomycorhizes et finalement sa grande

importance économique. Du côté du partenaire fongique, le choix de *Laccaria bicolor* (le laccaire) est justifié par le fait qu'il représente le premier champignon forestier symbiotique dont le génome a été séquencé. Le laccaire présente un intérêt environnemental, mais aussi économique et culturel. Mon projet de thèse s'est inscrit dans le cadre d'un programme de recherche visant à caractériser au niveau moléculaire la première étape du processus d'assimilation du Pi (l'absorption) du Peuplier et de son associé ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Ce travail a conduit à la caractérisation de la famille complète Pht1 chez ces deux organismes.

Les papiers inclus dans la thèse sont soit publiés, soumis ou en préparation.

1. G. A. Tuskan, S. DiFazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhalerao, R. P. Bhalerao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J. Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S. Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroove, A. Déjardin, C. dePamphilis, J. Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehlting, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein, M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, B. Hamberger, B. Heinze, Y. Helariutta, B. Henrissat, D. Holligan, R. Holt, W. Huang, N. Islam-Faridi, S. Jones, M. Jones-Rhoades, R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R. Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P. Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, D. R. Nelson, C. Nelson, K. Nieminen, O. Nilsson, **V. Pereda**, G. Peter, R. Philippe, G. Pilate, A. Poliakov, J. Razumovskaya, P. Richardson, C. Rinaldi, K. Ritland, P. Rouzé, D. Ryaboy, J. Schmutz, J. Schrader, B. Segerman, H. Shin, A. Siddiqui, F. Sterky, A. Terry, C.-J. Tsai, E. Uberbacher, P. Unneberg, J. Vahala, K. Wall, S. Wessler, G. Yang, T. Yin, C. Douglas, M. Marra, G. Sandberg, Y. Van de Peer, and D. Rokhsar. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313** (5793), 1596.
2. Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, **Pereda V**, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger, PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
3. **Loth-Pereda V**, Lucic E, Kohler A, Brun A and Martin F. Phylogenetic analysis, genomic organization and expression analysis of the inorganic phosphate transporter *Phl1* gene family in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. A soumettre, *New Phytologist*.
4. **Loth-Pereda V**, Kohler A, Buée M, Couturier J, Montanini B, Blaudez D and Martin F. Phosphate Transporter Family *Phl1* in Poplar. En préparation .

A. Principaux résultats

Dans le génome du laccaire (*Laccaria bicolor* H82-S238N) nous avons découvert cinq transporteurs de Pi putatifs appartenant à la famille *Pht1*. Cette famille est la plus nombreuse en comparaison avec d'autres basidiomycètes séquencés. L'analyse de la séquence, la forte conservation de la structure intron-exon et l'analyse phylogénétique, nous a permis mettre en évidence l'existence de deux vagues d'apparition des membres de cette famille pendant l'évolution. L'analyse *in silico* de cette famille de transporteurs a été détaillée dans la publication no. 3.

Dans le génome du peuplier (*Populus trichocarpa* cv *Nisqually*), douze modèles de gènes correspondant à des transporteurs de Pi (*Pht1*) ont été identifiés et corrigés de façon manuelle. Ce qui constitue une des plus grandes familles multigéniques de transporteurs de Pi connus chez les plantes (13 transporteurs de Pi chez le riz ; 9 transporteurs de Pi chez *Arabidopsis* ; 8 chez *H.vulgare* et *Z.mays* ; 5 transporteurs de Pi chez *S.lycopersicum* (tomate), et *S.tuberosum* (pomme de terre) ; 4 transporteurs chez *M.truncatula* and *V.vinifera* ; 2 transporteurs chez *S. rostrata* (Sesbania) ; et chez *G.max* (Soybean) ; 1 transporteur chez *L. japonicus*, *C. roseus*, *S.bicolor* (Sorghum). Ces transporteurs ont été nommés *PtrPht1;1* - *PtrPht1;12*.

B. Publication n°1 : The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray).
(*Science* 313, 2006, 5793, 1596-1604,)

C. Publication n°2 : The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis.
(*Nature* 452: 88-92, 2008).

A. Principaux résultats

Le niveau d'expression des transcrits des membres de cette famille a été étudié dans le mycélium végétatif, les carpophores et la mycorhize. Nos résultats démontrent que les cinq transporteurs de Pi (*LbPht1;1*, *LbPht1;2*, *LbPht1;3*, *LbPht1;4* et *LbPht1;5*) sont tous exprimés dans le mycélium, carpophore et la mycorhize. Cependant, leur niveau d'expression varie en fonction du type de tissu et lors de la carence en Pi de façon spécifique à chaque transporteur.

LbPht1;1 a présenté dans tous les états physiologiques du laccaire, une expression basale. *LbPht1;2* a présenté un niveau d'expression bas dans le mycélium et les carpophores dans des conditions non limitantes en Pi. La carence en Pi n'a pas modifié son niveau d'expression. Cependant, il était notamment supérieur dans les mycorhizes contrôles et carencées. Son patron d'expression suggère un rôle dans le métabolisme et plus spécifiquement dans le transport du Pi par voie symbiotique.

LbPht1;3 a présenté un niveau d'expression très fort dans le mycélium et la mycorhize non carencés en Pi. La carence en Pi du mycélium végétatif a entraîné une répression de ce transporteur mais ce phénomène n'a pas été observé dans les apex ectomycorhiziens carencés en Pi.

LbPht1;4 a présenté un niveau d'expression très haut dans le carpophore par rapport aux autres membres de la famille *Pht1*. Ceci suggère un rôle dans la translocation du Pi dans les différents compartiments du mycélium qui conforme le carpophore. Ce transporteur a montré aussi une forte dérégulation dans du mycélium carencé en Pi, montrant peut-être un rôle important dans la récupération du Pi du sol qui se trouve souvent à des teneurs de l'ordre du micromolaire. *LbPht1;5* a montré une

certaine répression dans du mycélium carencé en Pi alors qu'il a été fortement stimulé dans des apex mycorhiziens carencés en Pi, également. Ceci confirme l'hypothèse que la plante hôte a un impact sur la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme du mycobionte.

**B. Publication n°3 : Phylogenetic analysis, genomic organization and
expression analysis of the inorganic phosphate transporter *Pht1* gene family
in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor***

Structure and expression profile of the phosphate PHT1 transporter family of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* indicates a broad role in inorganic phosphate acquisition

Verónica Loth-Pereda, Eva Lucic, Annegret Kohler, Annick Brun and Francis Martin

UMR 1136 INRA/Nancy Université Interactions Arbres/Micro-organismes, INRA Nancy, 54280 Champenoux, France.

Author for correspondence:

Francis Martin Tel: (33) 383 39 40 80 Fax +33 383 39 40 69

Email: fmartin@nancy.inra.fr

Summary

- Phosphorus is a major nutrient acquired by plants and fungi via high-affinity inorganic orthophosphate (Pi) transporters. The molecular mechanisms underlying Pi transport in ectomycorrhizal symbiosis have been poorly investigated although they play a fundamental role in functioning of the symbiosis and host plant nutrition.
- Here, we describe features of the five genes coding for the PHT1 family of Pi transporters identified in the genome of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N-H82, their evolutionary history and expression during major developmental stages and growth on Pi-depleted medium.
- Whole genome oligoarrays and quantitative PCR showed that *LbPht1;3* and *LbPht1;5* were highly expressed in free-living mycelium grown on P-rich medium, whereas *LbPht1;4* was primarily expressed in fruiting body. All *LbPht1* transcripts accumulated at a high level in poplar ectomycorrhizal root tips, except *LbPht1;1*. The expression of *LbPht1;4* was markedly induced by Pi starvation, whereas *LbPht1;1* and *LbPht1;3* expression was downregulated.
- Our data suggest that individual PHT1 transporters may play a specific role in acquiring and translocating Pi in the different *L. bicolor* tissues. This symbiont has developed adaptative mechanisms to cope with limiting concentrations of Pi available in soils through increased Pi uptake and fine tuning of the differential expression of the *PHT1* family members in symbiosis.

Key words: ectomycorrhiza, expression analysis, gene duplication, *Laccaria bicolor*, phosphate transport, transcriptome

Introduction

Phosphorus availability is considered one of the major growth-limiting factors for plants in most forest ecosystems and tree species have developed several adaptive mechanisms to overcome inorganic orthophosphate (Pi) depletion stress (Marschner, 1995). The mutualistic interaction with arbuscular endomycorrhizal and ectomycorrhizal fungi is among the well-characterized responses to Pi deficiency in plants (Marschner & Dell, 1994; Brandes *et al.*, 1998; Poirier and Bucher, 2002; Karandashov *et al.*, 2004; Bucher, 2007). The ability to extract nutrients from soil litter is a defining feature of ectomycorrhizal symbionts (Harley & Smith, 1983), and secreted phosphatases and Pi transporters are necessary for this key process. The symbiotic interface, comprising the plant and fungal cell wall materials and plasmamembranes, have long been thought to be the zone by which the host plants derive nutrients, such as nitrogen and Pi, from their mycobionts (Smith & Smith, 1990). Owing to the difficulty in studying membrane proteins, only a limited set of transporters has been characterized so far (for a review see Chalot *et al.*, 2002; Nehls *et al.*, 2007). This should rapidly change in the near future as a comprehensive annotation of hexose and nitrogen compound transporters has been carried out on the *Laccaria bicolor* genome (Lucic *et al.*, 2008; Fajardo López *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2008). As expected from the complex exchange of ions and metabolites between the mycobiont and its host, there is an especially large number (*ca.*, 500) of predicted membrane-bound transporter proteins in *L. bicolor* genome (Martin *et al.*, 2008; Martin & Selosse, 2008). They are likely important for acclimation of the mycelium to the fluctuating, often nutrient-poor, conditions of soil environments (Marschner, 1995), but also for translocation of nutrients between the complex multicellular structures developed by the fungus, the ectomycorrhiza and fruiting body.

In free-living ectomycorrhizal fungi and mycorrhizas, absorbed Pi is incorporated into nucleic acids, phospholipids and other phosphorylated molecules or is condensed into inorganic polyphosphates (PolyP) (Martin *et al.*, 1983; Grellier *et al.*, 1989). The P-containing compounds are then translocated to the intraradical mycelium, possibly via cytoplasmic streaming and/or along a motile tubular vacuole system (Ashford *et al.*, 1975; Cooper and Tinker,

1981; Strullu *et al.*, 1982; Grellier *et al.*, 1989; Smith and Read, 1997; Morel *et al.*, 2005). The breakdown of PolyP is likely taking place in fungal hyphae at the symbiotic interface (Smith and Read, 1997). The mechanisms controlling the release of Pi from the Hartig net hyphae to the symbiotic interface are presently unknown. Pi is acquired by plant root cells and fungal hyphae by low- and high-affinity Pi transporters in an energy-mediated co-transport process driven by a proton gradient generated by plasma membrane H⁺-ATPases (Bucher, 2007). It is therefore widely thought that Pi released at the symbiotic interface is subsequently transferred into plant cortical cells via plant Pi transporters, the ultimate step in the mycorrhizal uptake pathway (Karandashov and Bucher, 2005). An efficient translocation of fungal Pi to the host plant requires a downregulation of the mycobiont Pi transporters residing in the fungal plasmamembrane facing the symbiotic interface to avoid any competition between the symbiotic partners. Recently, the regulation of plant and fungal Pi transporters in the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis or at the root/soil interface has been thoroughly studied (Smith *et al.*, 1997; López-Bucio, *et al.*, 2000; Chiou *et al.*, 2001; Rausch, *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2002; Mudge, *et al.*, 2002; Karandashov *et al.*, 2004; Misson *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Glassop, *et al.*, 2005; Nagy, *et al.*, 2005; Nagy, *et al.*, 2006; Javot *et al.*, 2007). The three AM Pi transporters identified so far (*GvPT*, *GiPT* and *GmosPT*, from *Glomus versiforme*, *G. intraradices* and *G. mosseae*, respectively) are all expressed in extraradical hyphae. This result is consistent with an activity of Pi uptake from the soil as suggested by (Harrison and van Buuren, 1995) and (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) for *GvPT* and *GiPT*, respectively. However, *GmosPT* expression was also observed in intraradical mycelium to a relatively abundant expression level (Benedetto *et al.*, 2005).

The yeast genome encodes five phosphate transporters (PHO84, PHO87, PHO89, PHO90 and PHO91) that are involved in a finely tuned Pi uptake. PHO84 and PHO89 are two high-affinity transporters that are both regulated by the *PHO* pathway: upon Pi-depletion, the transcription factor PHO4 is dephosphorylated and localized in the nucleus, where it activates transcription of phosphate regulated genes such as *PHO84* and *PHO89*. In Pi-repleted media, PHO4 is phosphorylated by the cyclin-dependent kinase PHO85, which causes its relocalization

to the cytosol and concomitant downregulation of Pi responsive genes (Oshima, 1997). The uptake and distribution of Pi in ectomycorrhizal fungi likely requires such multiple Pi transport systems that must function in concert to maintain homeostasis throughout growth and development of complex organs such as ectomycorrhiza and fruiting body, but detailed molecular studies are still lacking for ectomycorrhizal symbiosis. Despite the paramount importance of P metabolism in ectomycorrhizal associations (Harley & Smith, 1983), only two Pi transporters, *HcPT1* and *HcPT2*, have been characterized so far in an ectomycorrhizal fungus (Tatry, 2003). In *Hebeloma cylindrosporum*, *HcPT1* is expressed in the free-living mycelium and its expression increased upon Pi starvation. This expression pattern is consistent with a role in P acquisition from soil by ectomycorrhizal *Pinus pinaster* roots (Tatry, 2003). Further *in situ* RT-PCR transcript localization confirmed the expression pattern of *HcPT1* (van Aarle, *et al.*, 2007). A significant expression of *HcPT2* was only detected in ectomycorrhizal roots of pine seedlings grown in soil supplemented with Pi (Tatry, 2003).

The aim of this study was to establish a comprehensive genome-wide inventory of Pi transporters of the PHT1 family (TC No. 2.A.1.9) in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. PHT1 transporters are homologues of the yeast PHO84 Pi transporter and they belong to the major facilitator superfamily of proteins. The release of the genome sequence of this symbiotic fungus (Martin *et al.*, 2008), the presence of an extensive expressed sequence tag (EST) database (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/LaccariaGenome/>) and whole-genome expression oligo-arrays (WGEO) enabled genome screening and identification of *PHT1* transporter genes and transcripts. We identified five *PHT1* genes whose products present homology with known *PHT1* sequences. Genome organisation and evolutionary history of *PHT1* genes is described along with the regulation of gene expression during ectomycorrhiza and fruiting body formation, and upon Pi starvation.

Materials and Methods

Mycelium growth and media composition

Vegetative dikaryotic mycelium of *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton (strain S238N) was pre-cultured for 16 days in the dark at 23°C on Modified Melin Norkrans (MMN) liquid medium (Glucose 55 mM; KH_2PO_4 , 3.67mM; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3.78mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.34mM; NaCl, 0.43 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.61 mM; Thiamine, 0.1 mg/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.7 μM ; pH 5.5) covered by a semi-permeable cellophane membrane to allow easy medium replacement as described by (Lorrillou *et al.*, 1996). For nutrient deprivation experiments, *L. bicolor* S238N pre-cultures grown on agar medium were floated onto liquid MMN medium for 24 hours to allow acclimation. Mycelium was then grown on either complete MMN (Pi-repleted, mock-shift control) or on Pi-depleted media in which KH_2PO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were replaced by KCl and NH_4Cl , respectively. The mycelium of the edge of three colonies were sampled and frozen immediately, thus serving as the pooled control (0 h). All of the remaining 15 colonies were then individually moved onto liquid MMN medium with or without Pi. At intervals of 24 h, fungal colonies were transferred to fresh medium to avoid depletion of any other nutrients. Control- and Pi-depleted mycelia from the edge of the colonies were sampled at different times after transfer (24 h, 48 h, 72 h). For Pi refeeding experiments, Pi-depleted mycelia were returned to complete MMN liquid medium for 24 h. Harvested mycelia were then frozen in liquid nitrogen and stocked at -80°C before RNA extraction.

Mycorrhizal inoculation of *Populus trichocarpa*

All experiments were performed on greenwood cuttings of *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray ex Brayshaw) reference genotype INRA 101-74 kindly provided by Dr. C. Bastien (INRA, Orléans, France). Alginate beads containing mycelia of *L. bicolor* S238N were obtained using the method of (Mortier *et al.*, 1989) and were then mixed into sterile, acid-washed sand (1:20, v:v). Alginate beads without mycelium were used for mocked inoculation. Cuttings (10 cm length, 1 cm diameter) were then rooted in separate 2L pots with or without the inoculum in a glasshouse equipped with an ebb-and-flow flood bench system with twice daily supply of deionized water and twice weekly supply of the following growth solution: 7.91 mM KNO_3 , 7.9 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.69 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.2 ml of a trace-element

stock solution (Kanieltra, Nanterre, France.), pH 6. For the Pi-depletion experiment, plants were then irrigated with a Pi-free nutrient solution. In order to maintain Na at a constant concentration, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was replaced by NaCl. Plants were provided with 16 h of light daily (natural sunlight supplemented with metal halide lamps; light intensity: $1070 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) and 60% relative humidity. Glasshouse temperature was maintained at 21 to 23°C during the day and 14 to 18°C at night. All experiments were independently repeated five times, using a new batch of plants for each experiment. Each sample represented a plant material pool from at least three rooted cuttings. After two months of growth on Pi-depleted or complete solutions, mycorrhizal plantlets were harvested and ectomycorrhizal root tips induced by *L. bicolor* were collected (20 ectomycorrhizas per plant) under a compound microscope, immediately frozen in liquid N_2 and stored at -70°C for further analysis. Sequencing of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) was performed on randomly selected ectomycorrhizas according to (Martin *et al.*, 2004) in order to confirm the identity of *L. bicolor* ectomycorrhizas and exclude possible contaminations by other very competitive ectomycorrhizal fungi, such as *Telephora terrestris*, present in the glasshouse.

Ab initio and manual annotation of *Pht1* gene family

All *L. bicolor* sequences from the monokaryon S238N-H82 are available at the Joint Genome Institute (JGI) website (<http://www.jgi.doe.gov/laccaria>) and have been deposited at GenBank/EMBL/DBJ under project accession number ABFE01000000. Gene prediction on the *L. bicolor* JAZZ assembly (v1.0) was performed using four programs: GENWISE, FGENESH, TWINSKAN, and EUGENE, and the so-called Best Models were selected by JGI annotation pipeline (Martin *et al.*, 2008). Selection of gene models was based on EST support, coding sequence completeness, and homology to a curated set of proteins. *L. bicolor* PHT1 transporters were identified using three approaches. (1) known PHT1 protein sequences from *Coprinopsis cinerea* and other basidiomycetes (*e.g.*, *Hebeloma cylindrosporum* [Tatry, 2003], *Pholiota nameko* [Tasaki *et al.*, 2002]) were used to query the *L. bicolor* JGI gene catalog using BLASTP. (2) These basidiomycete PHT1 sequences were also used in TBLASTN query against the JAZZ (Martin *et*

al., 2008) and ARACHNE (Labbé *et al.*, 2008) *L. bicolor* sequence assemblies. (3) Gene models with a predicted phosphate permease domain (IPR004738) were identified using InterProScan (Zdobnov & Apweiler, 2001). All detected *PHT1* gene models were inspected manually and edited when required. Throughout the paper, JGI protein identification (ID) was used to identify these gene models. The final set of PHT1 proteins comprised the following: LbPHT1;1 (JGI Protein ID 255397), LbPHT1;2 (JGI Protein ID 396315), LbPHT1;3 (JGI Protein ID 314480), LbPHT1;4 (JGI Protein ID 297291) and LbPHT1;5 (JGI Protein ID 191924). Their NCBI GenBank accession numbers are XP_001889013, XP_001889026, XP_001889028, XP_001880970, XP_001888254 and XP_001888254, respectively.

Prediction of transmembrane domains and signal peptide

Prediction of putative transmembrane segments (TM) for PHT1s was performed using several programs: TMHMM, TM pred, Top Pred and prodiv-TMHMM (Hofmann and Stoffel, 1993; Claros and von Heijne, 1994; Viklund and Elofsson, 2004). Several TM domains of the fungal PHT1 were not detected by using the default parameters of these algorithms. They were however predicted using lower hydrophobicity threshold values (see Supplementary Table 4). Signal peptides were detected via SignalP3 using default parameters (Nielsen and Krogh, 1998; Bendtsen *et al.*, 2004). Synonymous and non-synonymous substitution rates in predicted PHT1 proteins were calculated with CRANN (Creevey & McInerney, 2002) based on codon-aligned gene sequences.

Sequence alignment and phylogenetic tree construction

Full-length amino acid sequences of PHT1 proteins from *L. bicolor* and other fungi were aligned by CLUSTALX (version 1.83.1) (Jeanmougin *et al.*, 1998) using default settings. The sequence alignment was imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Phylogenetic analysis were conducted using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap test

were conducted using 1000 replicates. The CLUSTAL sequence alignment was also exported as a NEXUS file and analysed using PAUP*4.08b (PPC/ Altivec) (Swofford, 1999). The NJ tree was then compared to trees generated by Maximum Parsimony (MP) to detect any algorithm-specific results. The MP tree was identified using heuristic searches using the Nearest-Neighbour Interchange branch-swapping option and MULPART in effect (Swofford, 1999). All characters were treated as unordered and with equal weight.

cDNA sequencing and intron-exon structure

Total RNA was isolated from *L. bicolor* S238N-H82 mycelium using the Rneasy Plant Mini kit (Qiagen, France). The Rnase-free Dnase set (Qiagen, France) was used to digest DNA during RNA purification. Full length doubled-stranded cDNAs corresponding to mRNAs expressed in mycelia were obtained by using the SMART-PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech). PCR amplification of the full length cDNA, from the start to the stop codon with primers designed using the nucleotide sequences of manually annotated *PHT1* gene models was performed on a GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin-Elmer Instruments, CT, USA) using the Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Successful PCR reactions resulted in a single band on a 0.8% agarose gel (Bioprobe, Qbiogene) in Tris Borate-EDTA and stained with ethidium bromide (2 µg/ml, Roche, France). Amplified products were purified with the Multiscreen PCR plate system (Millipore Corporation, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Direct cDNA sequencing was performed on the CEQ 8000XL automated sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Two nanograms of purified template cDNA were labelled during a cycle sequencing reaction with 5 ng CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) in a GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin Elmer Instruments). All full length cDNAs were sequenced by cDNA walking. Expressed sequence tags for *PHT1* genes were queried in the INRA LaccariaDB (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGCLaccariaGenome/>).

Intron and exon structure information for each predicted *PHT1* genes from *L. bicolor* and other sequenced basidiomycetes, *Cryptococcus neoformans* (Loftus *et al.*, 2005), *Ustilago maydis*

(Kämper *et al.*, 2006), *Malassezia globosa* (Xu *et al.*, 2007), *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), *Coprinopsis cinerea* (Stajich *et al.*, 2006), *Melampsora larici-populina* (Melampsora Genome Consortium), *Postia placenta*, *Sporobolomyces roseus* and *Puccinia graminis* was downloaded from the Broad Institute or JGI, whereas genes from nonsequenced fungal genomes (e.g., *Pholiota nameko*, Tasaki *et al.*, 2002) were downloaded from GenBank. Sequences from the genes and *L. bicolor* cDNAs were aligned using ClustalX, followed by marking the intron positions and then comparing the position and phase of all introns between genes.

Whole genome expression arrays

Accumulation of predicted *PHT1* transcripts was detected in free-living mycelium of *L. bicolor* S238N, poplar ectomycorrhizas and fruiting bodies using the *L. bicolor* whole genome expression oligoarray data described in Martin *et al.* (2008).

Measurement of transcript abundance by quantitative RT-PCR

About 100 mg of Pi-depleted and control *L. bicolor* S238N mycelia, and ectomycorrhizal tips were harvested, ground in liquid nitrogen and the total RNA was isolated using Qiagen Rneasy minikit (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). RNA samples were treated with Dnase for 15 minutes at room temperature and 600 ng of total RNA were used for the retrotranscription reaction (RT) using the iScript system (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions. Two microliters of RT products were amplified by PCR in 1x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France) with 0.3 mM of specific 5'- and 3'- primers designed for the five *L. bicolor* *PHT1* family members. Specificity of these primers has been confirmed by BLAST search on the *L. bicolor* genome (<http://www.jgi.doe.gov/laccaria>) and sequencing of RT-PCR products. The sequence corresponding to the intron-spanning forward qRT-PCR primers (to avoid co-amplification of genomic DNA) and rewind qRT-PCR primers are listed in Supplementary Table 1. cDNA fragments corresponding to either the constitutively expressed elongation factor 3 (JGI Protein ID: 293350), metalloprotease (JGI Protein ID: 245383) and GTPase (JGI Protein ID: 190157) genes were amplified simultaneously and used as

normalization controls. PCR was always performed in duplicates. At least three independent cDNA preparations from different biological samples were used for analysis. PCR efficiencies were calculated using five dilutions series of first strand cDNA samples. Primers used as controls or for analysis had an efficiency >95%.

Results

Annotation and genome distribution of *PHT1* transporter genes

Ten gene models coding for putative *PHT1* transporters were identified in the JGI predicted gene catalog resulting from the automated annotation of the *L. bicolor* JAZZ genome assembly (v1.0). However, manual curation confirmed the occurrence of only five putative *PHT1* transporters having a high sequence identity with known *PHT1* transporters; the largest set for a fungal species (Table 1). Two genes models corresponded to *PHT1* gene fragments likely resulting from transposon activity and three other gene models are coding for a glycerophosphoinositol permease of the MFS superfamily (Supplementary Table 2). The sequences of the curated set of *PHT1* genes were named *LbPht1;1*, *LbPht1;2*, *LbPht1;3*, *LbPht1;4* and *LbPht1;5* according to (Karandashov and Bucher, 2005). ESTs have been reported for the five *L. bicolor* *PHT1* transporters (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/LaccariaGenome/>) (Table 2). The corresponding genes are distributed over scaffolds 11, 53 and 61 of the JAZZ assembly (Table 2). *LbPht1;1*, *LbPht1;2* and *LbPht1;3* were located on scaffold 61, where *LbPht1;2* and *LbPht1;3* were only separated by 2,924 nucleotides, and a single small gene model coding for a hypothetical protein, suggesting that they constitute a tandem duplication. The co-localization of *LbPht1;1*, *LbPht1;2* and *LbPht1;3* genes was confirmed on the ARACHNE assembly. Finally, the *PHT1* loci were mapped on the finished assembly (v2.0) (J Grimwood & F Martin, unpublished results), anchored on the meiotic map (Labbé *et al.*, 2008), on linkage group/pseudochromosome 3 (*LbPht1;4*) and linkage group/ pseudochromosome 7 (*LbPht1;1*, *LbPht1;2*, and *LbPht1;3*). *LbPht1;5* was found on an unordered unmapped pseudochromosome.

Phylogenetic analysis

Pairwise comparison of the PHT1 protein family revealed levels of identity or similarity, *LbPht1;1*, *LbPht1;2* and *LbPht1;3* shared 61 to 65% identity, whereas they only shared 31 to 36% of identity to *LbPht1;4* and *LbPht1;5*. The latter were closely related with 69.8% identity (Supplementary Table 2). A NJ tree was constructed using *L. bicolor* PHT1 proteins and sequences from other fungal Pi transporters to investigate their evolutionary history. The fungal PHT1 proteins from ectomycorrhizal, saprotrophic or pathogenic fungi clustered in two distinct clades (referred to as subfamilies I and II) (Fig 1). The observed clustering is the result of amino acid sequence differences scattered throughout the whole proteins and not limited to a specific region. Subfamily I contained LbPHT1;1, LbPHT1;2 and LbPHT1;3 that grouped with Pi transporters of basidiomycetes only. They are closely related to the unique Pi transporter (CC1T03170) of the coprophilic *C. cinerea* and to HcPT2 from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum* (van Aarle, et al., 2007). Subfamily II contained PHT1 transporters of both basidiomycetes and ascomycetes that are related to the ancient Glomeromycota PHT1 proteins. It contained LbPHT1;4 and LbPHT1;5, and PHT1 from *P. chrysosporium*, *C. neoformans*, *P. placenta*, *S. roseus*, and PHO84 and PHO5 from *S. cerevisiae*. LbPHT1;4 has a close orthologue (HcPT1) in the ectomycorrhizal Agaricales *H. cylindrosporum*.

Intron/exon structure of PHT1 genes

Intron/exon structure of *PHT1* gene models was confirmed by cDNA sequencing. It showed two groups of sequences with strikingly different intron numbers, size and splicing site locations. These two divergent patterns were observed not only in *L. bicolor*, but also, to a some extent, in *P. chrysosporium*, *C. cinerea*, *H. cylindrosporum* and *P. placenta* (Fig 2a). They corresponded to members of the subfamilies I and II as shown in the NJ tree (Fig. 1). These intron/exon patterns were not found in the compact genomes of *Ustilago maydis* (intronless), *Cryptococcus neoformans*, and *Sporobolomyces roseus* nor in *Puccinia graminis* (Fig 2b).

Primary and secondary structure of *L. bicolor* PHT1s

High affinity Pi transporters of the PHT1 family are characterized by twelve hydrophobic

domains presumably spanning the plasma membrane, hydrophilic N- and C-termini localized in the cytoplasm and a large hydrophilic loop between transmembrane spanning domains 6 and 7 (Poirier and Bucher, 2002). This configuration is a structural feature of proteins belonging to the Major Facilitator Superfamily (MFS) and it is very well conserved in characterized Pi transporters of plants (Pao, *et al.*, 1998). Analysis of hydropathy profiles using the TOP PRED program allowed the detection of the 12 TM domains in the five *L.bicolor* PHT1 proteins by using a lower cut-off value for the hydrophobicity threshold (Supplementary Figure 2). They showed two blocks of six transmembrane spanners separated by a long hydrophilic loop, and hydrophilic N and C termini. Alignment of the proteins revealed extensive areas of similarity throughout the hydrophobic regions (Supplementary Figure 1). The conserved PHT1 signature, GGDYPLSxxIxSE, located in the fourth putative transmembrane domain (Karandashov and Bucher, 2005) was detected in all fungal predicted PHT1 proteins, but two patterns were clearly distinguished among members of the two subfamilies I and II (Fig. 1).

Analysis of the promoter sequences

Three out of the five *LbPht1* presented the P1BS motif (GNATATNC) (Rubio *et al.*, 2001; Schunmann *et al.*, 2004) in their 5' upstream non-coding sequence. *LbPht1;4* and *Lbht1;5*, belonging to subfamily II, presented this P1BS motif at positions -1,996 and -1,725, respectively (Table 2). Among subfamily I members, only *Lbht1;3* presented two P1BS motifs at positions -609 and -638, whereas *Lbht1;1* and *Lbht1;2* did not present this P1BS motif within 2400 nt upstream from the ATG codon.

PHT1 expression analysis

The expression profile of the *PHT1* gene family was first examined by using a custom whole genome expression oligoarray (Martin, *et al.*, 2008). Tissues were sampled either from ectomycorrhiza, fruiting body or free-living vegetative mycelium grown on Pi-rich agar medium. DNA oligorray results were validated by qRT-PCR. It is notable that *PHT1* genes showed a wide range of expression levels and distinct regulation during the fungus development. All components were expressed in all tissues analyzed (free-living mycelium,

ectomycorrhiza, and fruiting body) above a detectable level, indicating that none of these *PHT1* genes is a pseudogene. Although they are clear overlaps in the expression of these genes among tissues, typical expression patterns were observed (Fig. 3). Expression profile of *PHT1*s from subfamily I was as follows : *LbPht1;1* was barely detectable in ectomycorrhiza, fruiting body and free-living mycelium. *LbPht1;2* was mostly (and highly) expressed in ectomycorrhiza and to a lower extent in fruiting body, while its expression in free-living mycelium growing on MMN medium (7.5 mM Pi) was reduced to a basal level. *LbPht1;3* showed its highest expression in ectomycorrhiza; in this tissue, it was the *PHT1* gene with the highest expression. *LbPht1;3* also showed a very high expression in vegetative mycelium, whereas it has a low expression in fruiting body. Expression profiles of *PHT1* transporters belonging to subfamily II also revealed expression differences between *LbPht1;4* and *LbPht1;5*. The latter transcripts showed a similar level of expression in ectomycorrhiza and free-living mycelium grown on MMN-medium. *LbPht1;4* displayed the highest level of expression in fruiting body comparing to the other *PHT1* genes. *LbPht1;5* had also a high level of expression in fruiting body comparing to members of subfamily I but it was significantly lower than *LbPht1;4*.

Assuming that the transporter activities correlate with transcript levels, it appears from this transcript profiling that the *PHT1*-dependent transport of Pi mainly relies on *LbPht1;3* and *LbPht1;5* in free-living vegetative mycelium, grown on Pi-rich agar medium, on *LbPht1;4* and *LbPht1;5* in fruiting body, on all *PHT1*, except *LbPht1;1*, in ectomycorrhiza.

Expression of *L. bicolor* *PHT1* genes is regulated differently by Pi availability

Free-living mycelium

Levels of the five *LbPht1* transcripts were estimated using qRT-PCR of RNA isolated from control- and Pi-depleted mycelia sampled at different times (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) after transfer to Pi-rich or Pi-depleted media (Fig. 4). Transcript levels were modulated in the mycelia by depleting them in Pi. The level of *LbPht1;4* transcripts strongly increased by 4-fold that of the starting levels after 48 h and stabilized at this level for 72 h and even 120 h (data not shown).

Transcript accumulation decreased when Pi was resupplied into the medium for 24 h, suggesting that *LbPht1;4* was derepressed by Pi-depletion (Fig 4a and 4b). *LbPht1;2* showed a slight increase in transcript levels after 48 h of Pi depletion, but returned at their constitutive levels after 72 h. On the other hand, *LbPht1;1* and *LbPht1;3* showed decreased levels of their transcripts upon Pi depletion. *LbPht1;1* showed a very low expression level in free-living mycelium and its decrease upon Pi starvation was not as significant as for *LbPht1;3* which presented the highest level of transcript at T0 in comparison with other *PHT1s* (Fig. 4b). *LbPht1;3* transcript level increased rapidly after refeeding Pi for 24 h.

Ectomycorrhiza

Ectomycorrhizal root tips of *L. bicolor* were harvested on *P. trichocarpa* plantlets irrigated for two months using a Pi-depleted medium. These plants therefore only relied for their growth on Pi stored in perennial tissues of cuttings. The rate of mycorrhiza formation of control- and Pi-deprived plants was about 50% and no statistically significant difference was observed between treatments (data not shown). Microscopic observations however suggested a more developed intraradicular Hartig net in ectomycorrhizal root-tips from Pi-deprived plants than control plants (data not shown). It can be assumed that ectomycorrhizas were symbiotically active since a positive increase in total biomass of mycorrhizal Pi-deprived plants ($+ 7.03 \pm 0.5$ g fresh weight) comparing to non-mycorrhizal Pi-deprived plants was observed ($+ 3.26 \pm 0.7$ g fresh weight). Lack of Pi in the growth solution lead to dramatic changes in transcript levels of fungal *LbPht1s* in symbiotic tissues. The transcript levels of *LbPht1;2*, *LbPht1;3* and *LbPht1;4* were increased up to 30-fold, whereas *LbPht1;5* expression was upregulated 256-fold (Fig 4c), by comparison to the control mycorrhizal plants. On the other hand, *LbPht1;1* was barely detected in control- and Pi-deprived plants.

Discussion

The high number of Pi transporters present in the ectomycorrhizal tree species, *Populus trichocarpa*, including endomycorrhiza- and ectomycorrhiza-induced genes (Tuskan *et al.*, 2006;

V Loth-Pereda, unpublished), is likely a reflection of the complexity and significance of the Pi acquisition process for the symbiosis ecophysiological fitness. In ectomycorrhizal plants, inorganic orthophosphate (Pi) is the form which moves through the extraradical hyphal web and mantle sheath from the external soil solution to the host root (Harley & Smith, 1983). Phosphate transporters of the fungal partner therefore play a crucial role in symbiosis P metabolism and then, plant nutrition. However, the roles of the individual Pi transporters and their contributions to this process are unknown. The completion of the *L. bicolor* genome sequencing has revealed that the PHT1 family of Pi transporters genes contains a total of five members belonging to two divergent evolutionary clades. We showed that the PHT1 transporter family has expanded in *L. bicolor* by comparison to other sequenced basidiomycetes. Phylogenetic analysis suggested that members of subfamily II are evolutionarily older than subfamily I, because it contained sequences from both Ascomycetes and Basidiomycetes species. In addition, Glomeromycota PHT1 were closer to subfamily II than to subfamily I predicted proteins. Conservation of different intron-exon structures and the existence of two sequence patterns specific to each subfamily members for the highly conserved PHT1 signature (Fig.1), supported this contention. Taken together, these analyses strongly suggest divergent evolutionary histories for the two subfamilies. Gene duplication has been followed by changes in expression levels and regulation of paralogous pairs. It appears that the clade comprising *LbPht1;4* and *LbPht1;5* predated the apparition of the *LbPht1;1*, *LbPht1;2*, *LbPht1;3* branch. The latter, more recent clade of PHT1 transporters being restricted to Basidiomycota. The saprotrophic coprophilous *C. cinerea* and brown-rot *P. placenta* have a single subfamily II-PHT1 transporter with a protein sequence close to *LbPHT1;1* (Fig.1), suggesting that *LbPHT1;2* and *LbPHT1;3* have evolved from *LbPHT1;1* by gene duplication. They are highly expressed in ectomycorrhizas and showed a striking upregulation in symbiotic tissues of Pi-deprived poplars suggesting that they may have evolved with the symbiotic lifestyle.

Paralogous *PHT1* genes differed in their level of transcriptional control, with *LbPht1;1* showing very low, constitutive expression, while *LbPht1;2* and *LbPht1;3* are under strong

transcriptional regulation. *LbPhT1;2* showed a low level of expression in free-living mycelium grown on Pi-rich medium and fruiting body comparing to other *L. bicolor PhT1* genes except *LbPhT1;1*. It was not responsive to Pi starvation in free-living mycelium. In contrast, it was induced at a high level in ectomycorrhizas of control- and Pi-depleted poplar plantlets. Its expression profile therefore suggests that it plays a role in symbiotic Pi metabolism. *LbPhT1;3* had a very different expression profile comparing to its paralogues of subfamily I. It showed a very high expression in mycelium grown on high level of Pi and ectomycorrhizal root tips, whereas its expression was strikingly decreased in Pi-depleted liquid medium mycelium but not in Pi-depleted ectomycorrhizal root tips. It would be interesting to know whether this downregulation is due to the presence of two P1Bs motifs located upstream of the ATG codon. Members of the subfamily II, *LbPhT1;4* and *LbPhT1;5*, showed specific expression profiles. The very high level of expression of *LbPhT1;4* in fruiting body suggests that this transporter is probably involved in Pi movement and recycling within the different tissues (e.g., stipe, cap) of the fruiting body. Although, *LbPhT1;4* was weakly expressed in free-living mycelium, it showed a dramatic upregulation upon Pi starvation; it likely plays a scavenger role within the *L. bicolor PHT1* gene family as shown in other basidiomycetes (Tasaki *et al.*, 2002; Tatry, 2003). Finally, expression of *LbPhT1;5* was not regulated in Pi-depleted mycelium, but strongly up-regulated (256-fold) in Pi-depleted ectomycorrhizas, confirming that the host plant impacts the regulation of genes involved in the mycobiont metabolism (Martin *et al.*, 2001) and overrides the fungal transcriptional regulation. The *LbPHT1;5* protein comprises a significant proportion of the inducible Pi-starvation Pi transport capacity of the symbiotic root and may enable the ectomycorrhizal plant to take advantage of a high-Pi supply following a period of Pi-depletion. Interestingly, *LbPhT1;4* and *LbPhT1;5* present a P1Bs motif at -1,996 and -1,725 from ATG and these two genes were the most highly upregulated in Pi-depleted mycelium and Pi-depleted ectomycorrhiza, respectively. The identity of the transcriptional factor involved in this regulation remains elusive as the MYB factor interacting with the P1Bs motif has no homolog in the *L. bicolor* genome. *L. bicolor PHT1* repertoire is thus able to play a role in Pi acquisition under both low- and high-Pi conditions which result from the patchy distribution of Pi and other

nutrients in forest soils (Marschner & Dell, 1994). In conjunction with secreted acid phosphatases and ribonucleases (Harley & Smith, 1983), PHT1 transporters upregulated by Pi depletion likely represent an adaptative mechanism for Pi deficiency. Transcript profiling of Pi-depleted *L. bicolor* is currently underway to characterize additional genes responsive to Pi-depletion.

It has been suggested that the presence of *GmosPT* transcripts in the intraradical mycelium of endomycorrhiza implies that the efflux of Pi to the symbiotic apoplast space is occurring in competition with its uptake by fungal cell and that the fungus would thus exert a control over the amount of Pi delivered to the plant (Benedetto, *et al.*, 2005). Based on this model of Pi transfer, it is likely that ectomycorrhizal fungal PHT1 transporters play a role in balancing and controlling the amounts of Pi released to the plant and they could possibly be also regulated by photosynthetic activity and transfer of carbon from plant to fungus across the mycorrhizal interface. The fact that all *LbPht1* genes were expressed at a higher level during symbiosis and derepressed during Pi depletion in poplar plantlets suggest that a competition for apoplastic Pi likely takes place between plant and fungal cells at the symbiotic interface upon Pi-depletion conditions. By contrast, a higher expression of PHT1 transporters at the mantle/soil interface would lead to a higher absorption of soil Pi. Laser microdissection of symbiotic tissues and immunolocalization of the individual PHT1 transporter will allow the characterization of cellular and tissular localization of *L. bicolor* PHT1 transcripts. This approach will also be used for quantifying plant and fungal Pi transporter genes contemporaneously present in ectomycorrhizal tissues and investigate their co-regulation upon symbiosis development and low Pi conditions. Interestingly, symbiosis functioning is accompanied by the upregulation of several plant and fungal ammonium and hexose transporters in *L. bicolor*/*P. trichocarpa* association (Couturier *et al.*, 2007; Fajardo López *et al.*, 2008; Lucic *et al.*, 2008). Therefore, it is possible that symbiotic signals are transmitted to the fungal partner through certain carbon assimilates and/or symbiosis-specific signalling molecules.

Our data provides the first insights into the role of the PHT1 transporter family in an

ectomycorrhizal fungus and reveal unexpected contributions to Pi acquisition and symbiosis metabolism. This study and those recently published on hexose and nitrogen compound transporters (Lucic *et al.*, 2008; Fajardo López *et al.*, 2008) pave the way for the dissection of the complex mechanisms underlying nutrient uptake and translocation in ectomycorrhizal symbiosis.

Acknowledgements

V.L-P was supported by a PhD fellowship from Conacyt-Conafor (National Council of Science and Technology National Forestry Commission, Mexico). We would like to thank the US DOE JGI and the *Laccaria* Genome Consortium for access to the *L. bicolor* genome sequence before publication. We thank Aurélie Deveau and Marlis Reich (INRA) for kindly providing *L. bicolor* material and housekeeping gene primers and Patrice Vion for technical support for glasshouse experiments. This project was supported by grants from the Région Lorraine, the European project POPYOMICS and the Network of Excellence EVOLTREE to FM.

References

- Ashford AE, Ling Lee M, Chilvers GA. 1975. Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. *New Phytol* **74**: 447-453.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L. 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.
- Brandes B, Godbold D, Kuhn A, Jentschke G. 1998. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytol* **140**: 735-743.
- Bucher M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol* **173**: 11-26.
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cook R, Sentenac H, Wipf D, Botton B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil* **244**: 165-175.
- Claros MG, von Heijne G. 1994. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *CABIOS* **10**: 685-686.
- Creevey C, McInerney JO. 2002. An algorithm for detecting directional and non-directional positive selection, neutrality and negative selection in protein coding DNA sequences. *Gene* **300**: 43-51.
- Couturier C, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M. 2007. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* **174**, 137-150.
- Crooks G, Hon G, Chanonia J and Brenner S. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* **14**: 1188-1190.
- Fajardo López M, Dietz S, Grunze N, Bloschies J, Weiß M, Nehls U. 2008. The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: Function in ectomycorrhizal symbiosis and soil growing hyphae. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02539.x
- Grellier B, Strullu DG, Martin F, Renaudin S. 1989. Synthesis in vitro, microanalysis and ³¹P-NMR study of metachromatic granules in birch mycorrhizas. *New Phytol* **112**: 49-54.
- Harley JL, Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London
- Harrison MJ, van Buuren M. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Hofmann K, Stoffel W. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 166.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ* **30**: 310-322.
- Jeanmougin F, Thompson J, Gouy M, Higgins D, Gibson T. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**: 403-405.

- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O *et al.* 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101.
- Karandashov V, Bucher M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science* **10**: 22-29.
- Labbé J, Zhang X, Yin T, Schmutz J, Grimwood J, Martin F, Tuskan GA, Le Tacon F. 2008. A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytologist*, in the press.
- Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA *et al.* 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **307**: 1321-1324.
- Lorrillou S, Botton B, Martin F. 1996. Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP-glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytol* **132**: 289-296.
- Lucic E, Fourrey F, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A. 2008. A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02580.x
- Maldonado-Mendoza I, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001. A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microb Interact* **14**: 1140-1148.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Marschner H, Dell B. 1994. Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant & Soil* **159**, 89-102.
- Martin F, Canet D, Rolin D, Marchal JP, Larher F. 1983. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of polyphosphate metabolism in intact ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **71**: 469-476.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* **151**: 145-154.
- Martin F, Diez J, Dell B and Delaruelle C. 2004. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol* **153**: 345-357.
- Martin F, Selosse MA. 2008. The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist*, in press.
- Martin F, Aerts A, Ahren D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V *et al.* 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MDS, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Dettler JC, Larimer F *et al.* 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* **22**: 695-700.
- Mortier F, Le Tacon F and Garbaye J. 1989. Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in a nursery. *Agric. Ecosyst. Environ* **28**: 351-354.
- Nielsen H, Krogh A. 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6**: 122-130.

- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Küster H. 2007. Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* **68**: 82-91.
- Oshima Y. 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Genetic Systems* **72**: 323-334.
- Pao SS, Paulsen IT and Saier MH, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1-34.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133.
- Schunmann PH, Richardson AE, Vickers CE, Delhaize E. 2004. Promoter analysis of the barley *Phl1;1* phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiol* **136**: 4205-4214.
- Smith SE, Smith FA. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* **114**: 1-38.
- Smith SE and Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Stajich JE, Birren B, Burns C, Casselton LA, Dietrich F, Fargo DC, Gathman AC, James TY, Kamada T, Lilly WW et al. 2006. Genomic analysis of *Coprinus cinereus*. In: *Proceedings of the International Symposium on Mushroom Science*. Akita Prefectural University, pp. 59-74.
- Swofford D. 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tasaki Y, Kamiya Y, Azwan A, Hara T, Joh T. 2002. Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: accumulation of mRNAs for two transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 790-800.
- Tatry M. 2003. Analyse moléculaire des effets bénéfiques de la symbiose ectomycorhizienne sur la nutrition phosphatée de la plante-hôte: identification de deux systèmes de transport de Pi chez le basidiomycète ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. Ph.D. Thesis, University of Montpellier II, France.
- Tuskan G, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*. *Science* **313**: 1596-1604.
- van Aarle IM, Viennois G, Amenc L, Tatry M, Luu D, Plassard C. 2007. Fluorescent *in situ* RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **17**: 487-494.
- Vanden Wymelenberg A, Minges P, Sabat G, Martinez D, Aerts A, Salamov A, Grigoriev I, Shapiro H, Putnam N, Belinky P et al. 2006. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genetics & Biology* **43**: 343-356.
- Viklund H, Elofsson A. 2004. Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Science* **13**: 1908-1917.

Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, Deangelis YM, Reeder NL, Johnstone KR, Leland M et al. 2007. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18730-18735.

Zdobnov EM, Apweiler R. 2001. InterProScan -- an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17: 847-848.

Legends of Figures

Figure 1. An unrooted, phylogenetic tree of PHT1 transporters of *Laccaria bicolor* and other fungi (a) and sequence logos of subfamilies I and II showing the consensus PHT1 protein signatures. JGI protein IDs from genomes available at JGI website (<http://www.jgi.doe.gov/>) were: *Phanerochaete chrysosporium*, Phchr_128372, Phchr_131308, Phchr_125289, and Phchr_137755. Protein IDs from genomes available at Broad Institute website (<http://www.broad.mit.edu/>) were: *Puccinia graminis*, PGTG_01917.2 and PGTG_04147.2; *Rhizopus oryzae*, RO3G_01668.1, RO3G_04857, RO3G_00398.1 and RO3G_15988.1; *Coprinus cinereus*, CC1G_03170.1; *Cryptococcus neoformans*, CNAG_02777; and *Ustilago maydis*, UM00800.1 and UM06490.1. Other sequences were retrieved from GenBank: CAI94747, CAI94750 (*Hebeloma cylindrosporum*); AF359112_1 (*Glomus intraradices*); AAC49132 (*Glomus versiforme*); DQ074452 (*Glomus mosseae*); AAA74899 (PHO-5, *Neurospora crassa*); P15710 (PHO5, *N. crassa*) and NP_013583 (PHO84, *Saccharomyces cerevisiae*). Bootstrapping was calculated with PAUP*. Sequence logos of subfamilies I and II were generated using WEBLOGO to show the consensus PHT1 protein signature (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks *et al.*, 2004).

Figure 2. Comparison of the intron-exon structure within basidiomycete *PHT1* genes. (a)

Conservation of intron-exon structure was observed in *L. bicolor* *PHT1* genes and the two patterns were correlated to member of subfamilies I and II. Patterns were conserved to some extent in *P. chrysosporium* (Phchr131308, Phchr128372, Phchr125289 and Phchr137755), *C. cinereus* (CC1G_03170.1), *P. placenta* (Pospl121375 and Pospl44327), *S. roseus* (Sporo21266), and *H. cylindrosporum* (HcPT1 and HcPT2). (2b) Intron-exon structure in *PHT1* sequences from other sequenced fungi where the intron-exon structure is less conserved or are intron-less. *A. niger* (Asni121846 and Asni190334); *U. maydis* (UM00800.1 and UM06490.1); *P. graminis* (PGTG_01917.2 and PGTG_04147.2); *R. oryzae* (RO3G_01668.1, RO3G_04857, RO3G_00398.1 and RO3G_15988.1); and *C. neoformans* (CNAG_02777). Black boxes represent exons and white ones introns.

Figure 3. Expression of *L. bicolor* PHT1 genes at different developmental stages. Transcript levels of *L. bicolor* PHT1 genes were determined by quantitative RT-PCR analysis of total RNAs, using intron-spanning primers that distinguish among *LbPht1* family members. Transcript levels were normalized to those of three housekeeping genes (a metalloprotein, elongation factor 3 and a GTPase) and are expressed relative to the Pi transporter showing the highest expression in each tissue, which is set at 100. Values are the mean ($\pm$ s.d.) of three biological replicates. **(a)** agar grown mycelium **(b)** Fruiting body, **(c)** *L. bicolor*/*Populus trichocarpa* ectomycorrhizas. **(d)** Transcript level *L. bicolor* PHT1 genes measured using a NimbleGene whole genome oligoarray in agar-grown mycelium, fruiting body and ectomycorrhiza.

Figure 4. Effect of Pi depletion on PHT1 transcript levels in free-living mycelium and poplar ectomycorrhizas. Transcript level of *L. bicolor* PHT1 genes was determined by qRT-PCR. Values are the mean ($\pm$ s.d.) of three biological replicates. **(a)** Time course of changes in PHT1 transcripts upon Pi depletion and after Pi refeeding. Transcript levels at each sampling time are expressed relative to the transcript level at time zero **(b)** Time course of changes in PHT1 transcripts upon Pi depletion and after Pi refeeding. Transcript levels are expressed relative to the highest transcript level (*LbPht1;3* at T 48h), which was set at 100. **(c)** Relative changes of PHT1 transcript levels in Pi-depleted ectomycorrhizal root tips. Transcript levels in Pi-depleted ectomycorrhizas are expressed relative to the transcript level in ectomycorrhizas of control plants.

Table 1 Number of PHT1 transporter genes in basidiomycetes. Occurrence of *PHT1* genes were confirmed by BLAST and topology prediction of secondary structures (TMHMM).

Species	Predicted <i>PHT1</i> genes	References
<i>Laccaria bicolor</i>	5	Martin <i>et al.</i> (2008)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	4	Martinez <i>et al.</i> (2004), Vanden Wymelenberg <i>et al.</i> (2006)
<i>Puccinia graminis</i>	2	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/puccinia_graminis
<i>Coprinus cinereus</i>	1	Stajich <i>et al.</i> (2006)
<i>Ustilago maydis</i>	2	Kämper <i>et al.</i> (2006)
<i>Postia Placenta</i>	2	http://genome.jgi-psf.org/Pospl1/Pospl1.home.html
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	Loftus <i>et al.</i> (2004)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html

Table 2 Principal features of the *Laccaria bicolor* PHT1 genes.

Gene Name	Protein ID	Genome Location ^a	Introns	CDS size (nt)	P1Bs motif ^b	EST ^c
<i>LbPht1;1</i>	255397	Sc_61: 65219-67605 Super1216: 633322-630936 59681: 625807-628193, LG7	15	1548	None	1
<i>LbPht1;2</i>	396315	Sc_61: 142342-144839 Super 1216: 559030-556533 59681: 551157-553654, LG7	13	1629	None	2
<i>LbPht1;3</i>	314480	Sc_61: 147763-150285 Super 1216: 553609-551087 59681: 545714-548233, LG7	15	1662	- 609, -638	7
<i>LbPht1;4</i>	297291	Sc_11: 1074620-1076805 Super 1199: 374971-377156 59571: 385303-387488, LG3	9	1635	- 1,725	1
<i>LbPht1;5</i>	191924	Sc_53: 75134-77432 Super 1195: 6734944-6732646 59502: 63963-66261, unordered, unmapped	10	1689	- 1,996	1

^a Gene coordinates on JAZZ scaffold (sc), ARACHNE supercontigs (Super), finished pseudochromosomes and linkage groups (LG)

^b Coordinates of P1Bs motifs upstream of the ATG codon

^c Denotes the presence of ESTs in the INRA LaccariaDB database and NCBI GenBank (accession # EX785087.1, EX796365, EX796364, EX796367.1, EX796366.1, EX791059.1, EX780020.1, EX790782.1, EX791058.1, EX790781.1, EX814973.1, EL738857).

Figure 1

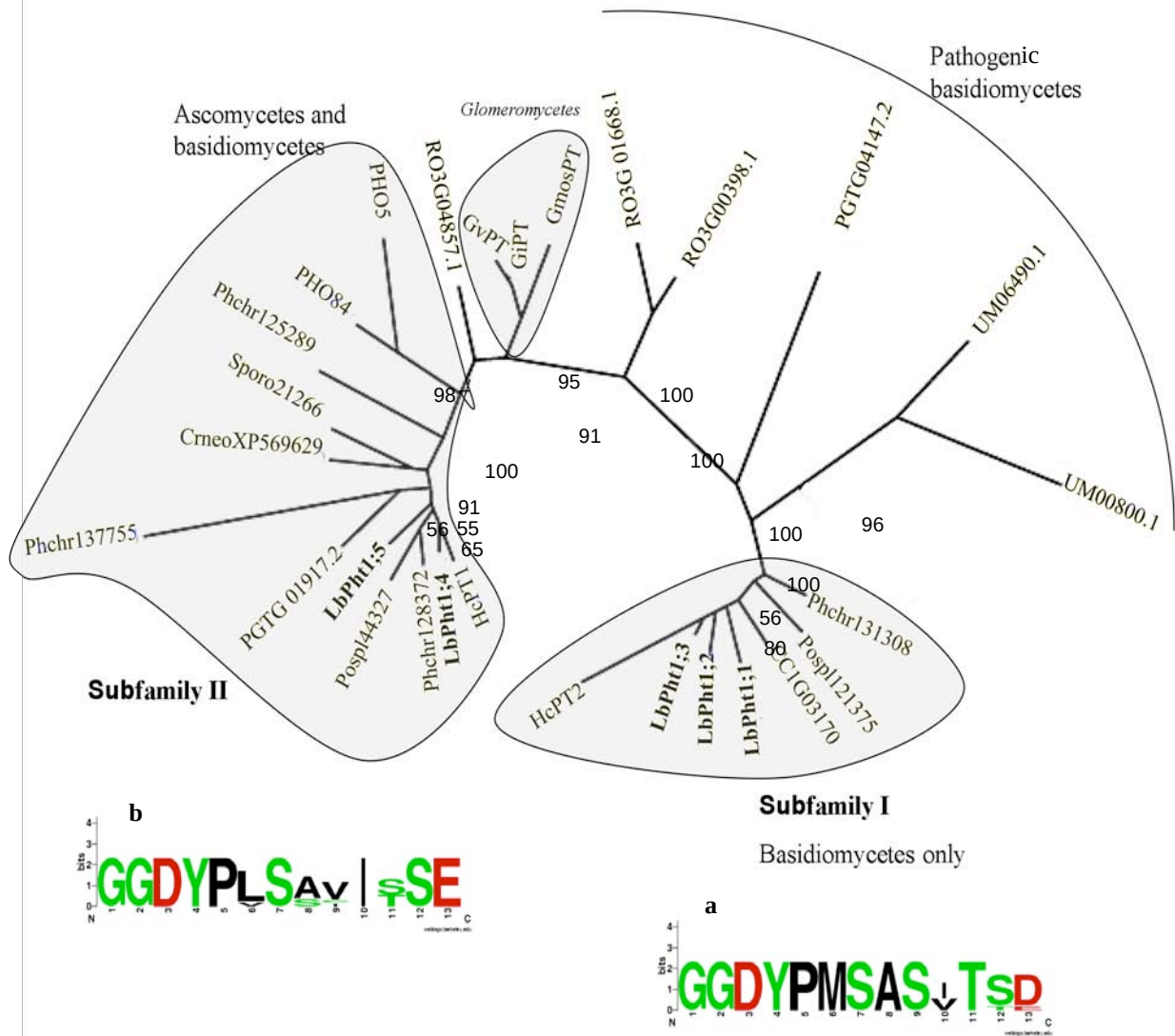


Figure 2



Figure 3

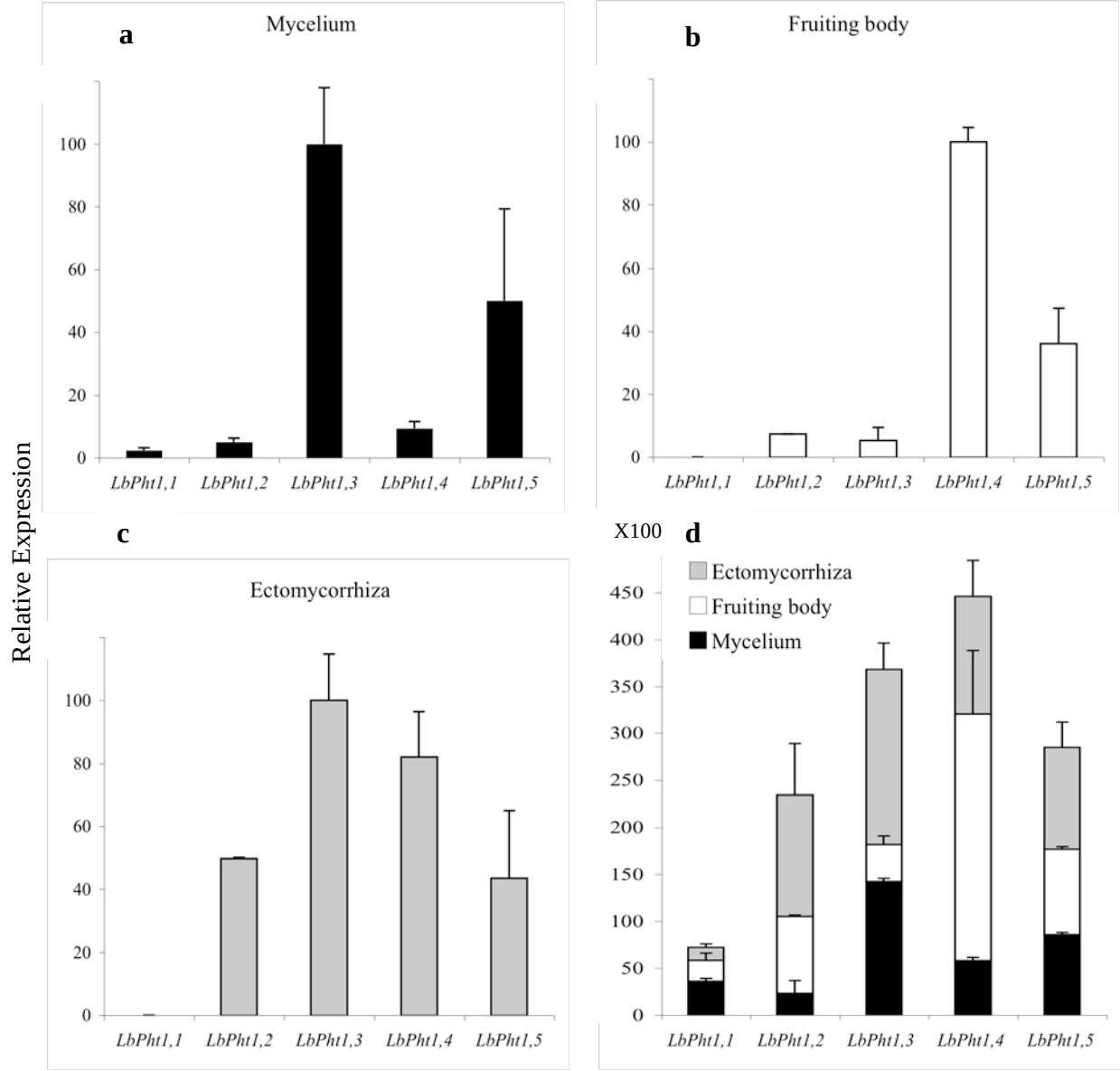
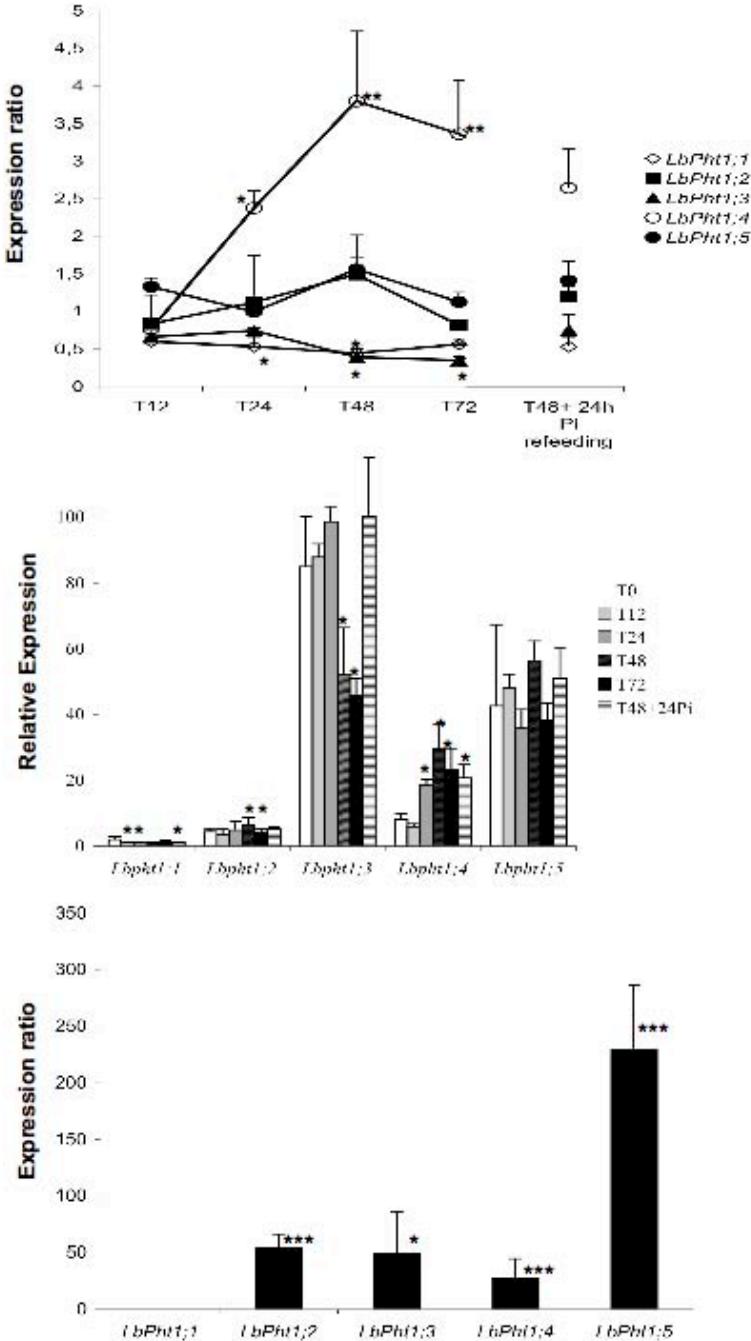


Figure 4



Supplementary Information

Table S1. Primers used for qRT-PCR analysis.

Primer name	Protein ID	Primer sequence
LbPht1;1f	255397	5'-CTCGATGCATACGACCTGTTC-3'
LbPht1;1r		5'-AAGCTCCTTGCCGTAGACAG-3'
LbPht1;2f	396315	5'-TGGGTATCTTGCTGACTCTCTG-3'
LbPht1;2r		5'-CCAATGCCAAGGAGGATG-3'
LbPht1;3f	314480	5'-AACCCTGTTTCTACCATGCTTC-3'
LbPht1;3r		5'-CTTTTCGACCGAGGGAGTC-3'
LbPht1;4f	297291	5'-CATGGGTTTCGGTTACGAC-3'
LbPht1;4r		5'-GGTAGAGCGATAGCGAGTGG-3'
LbPht1;5f	191924	5'-GATGTACGGCTTGGAAGTGTGTC-3'
LbPht1;5r		5'-ATCGCGCTAAGTGGGTAATC-3'
EF3f (Elongation factor 3)	293350	5'-CTCATCCTTCCTGCTCTTCTTCACG-3'
EF3r		5'-CGGTGGCTTTTGTAAGTGAATCACG-3'
MPf (Metalloprotease)	245383	5'-ATCAAACGATGGTGTGTTATTCTT-3'
MPr		5'-GTCGTCGCTATAATCCATAAAGTTG-3'
GTPf (Guanine nucleotide binding protein)	190157	5'-ATGATTCTTACGGATACCCTAAACG-3'
GTPr		5'-AGTGTTAAGATCCCAAAGACGAAG-3'

Table S2. Gene models initially identified as *PHT1* genes by the automated JGI annotation pipeline in the *L. bicolor* genome assembly (JAZZ v1.0) (<http://www.jgi.doe.gov/laccaria>). The definition line in the JGI *L.bicolor* database was corrected after manual curation.

JGI Gene models	Curator remarks
gwh1.47.35.1	Gene fragment (202 bp)
e_gwh1.97.8.1	Gene fragment (336 bp)
e_gww1.1.290.1	Gene coding for a glycerophosphoinositol permease (MFS superfamily)
eu2.Lbscf0011g03120	Gene coding for a glycerophosphoinositol permease (MFS superfamily)
eu2.Lbscf0008g05450	Gene coding for a glycerophosphoinositol permease (MFS superfamily)

Table S3. Pairwise matrix of protein sequence identity/similarity for the *L. bicolor* PHT1s

Identity (%)					
	<i>LbPht1;1</i>	<i>LbPht1;2</i>	<i>LbPht1;3</i>	<i>LbPht1;4</i>	<i>LbPht1;5</i>
<i>LbPht1;1</i>	100	61.4	65.1	36.6	33.6
<i>LbPht1;2</i>	72.2	100	65.6	34.3	31.7
<i>LbPht1;3</i>	74.6	75.7	100	35.6	34
<i>LbPht1;4</i>	50.3	49.9	51.2	100	69.8
<i>LbPht1;5</i>	49.2	47.7	47.6	69.8	100
Similarity (%)					

Table S4 Number of transmembrane domains predicted by several programs in fungal

PHT1s

Genes	TMHMM	TM Pred	Top Pred^a
<i>Laccaria bicolor</i>			
<i>LbPht1;1</i>	10	11	12
<i>LbPht1;2</i>	10	11	12
<i>LbPht1;3</i>	10	11	12
<i>LbPht1;4</i>	11	12	12
<i>LbPht1;5</i>	11	12	12
<i>P. chrysosporium</i>			
e_gwh2.4.612.1	10	11	12
fgenes1_pg.C_scaffold_7000317	10	11	12
e_gww2.5.161.1	10	11	12
e_gwh2.27.9.1	9	10	11
e_gww2.3.194.1	9	10	11
<i>Aspergillus niger</i>			
gw1.8.159.1	9	11	11
e_gw1.13.446.1	12	12	12
<i>Rhizopus oryzae</i>			
RO3G_01668.1	12	12	12
RO3G_00398.1	12	12	12
<i>H. cylindrosporum</i>			
<i>HcPT1</i>	10	12	12
<i>HcPT2</i>	10	12	12
<i>Puccinia graminis</i>			
PGTG_01917.2	11	12	12
PGTG_04147.2	9	11	11
<i>Glomus intraradices</i> AF359112_1	11	12	12
<i>Glomus versiforme</i> AAC49132	11	12	12

^a a lower cut-off of hydrophobicity threshold was used

Legends of Figures

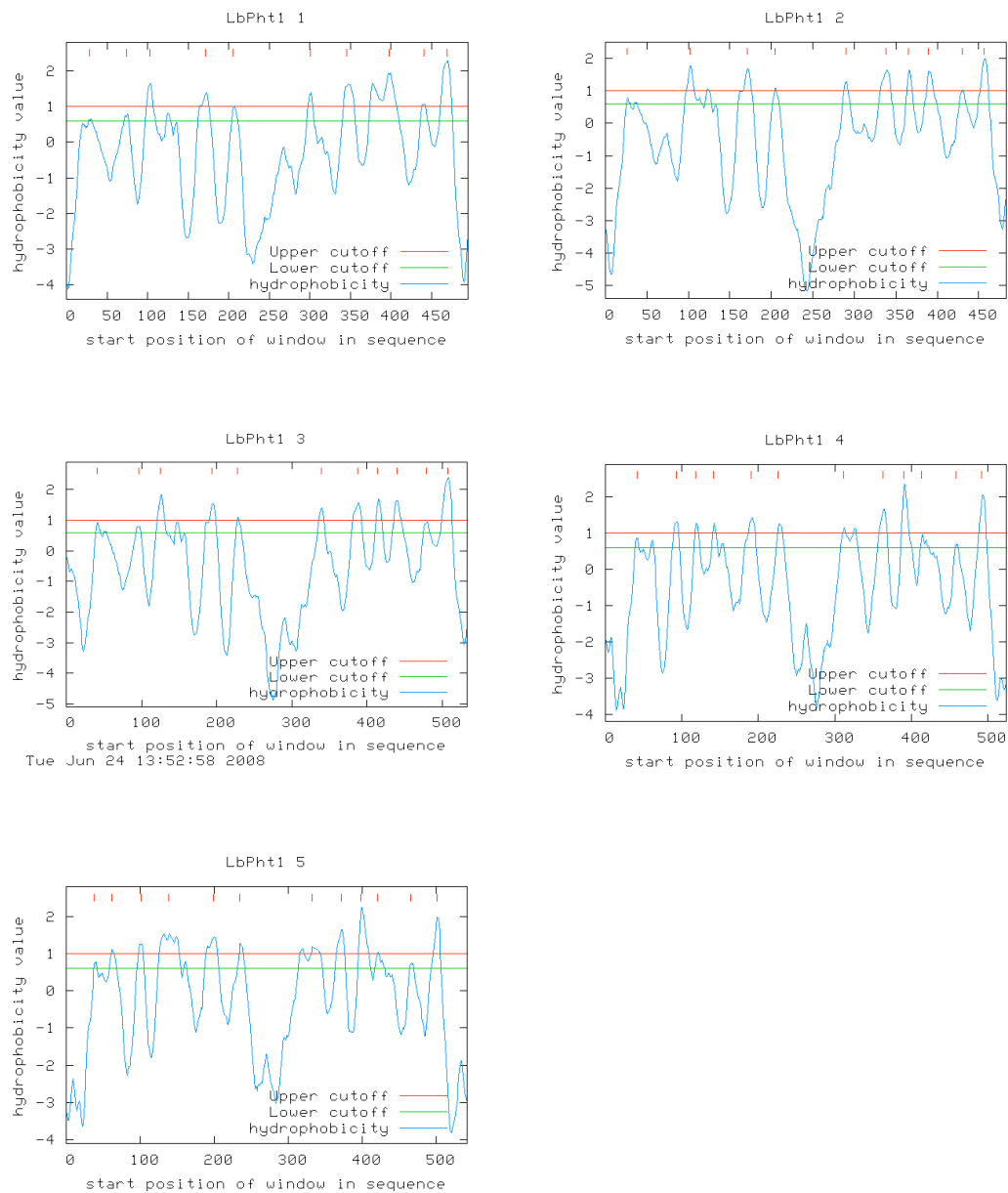
Fig. S1. Multiple alignment of *L. bicolor* PHT1 transporters using ClustalW

Fig. S2. Prediction of transmembrane domains of *L. bicolor* PHT1 proteins using TopPred (Claros and von Heijne, 1994).

Supplementary Figure 1

[illegible]

Supplementary Figure 2



**B. Publication n°4 : Structure and expression profile of the phosphate PHT1
transporter gene family in *Populus trichocarpa***

Structure and expression profile of the phosphate PHT1 transporter gene family in *Populus trichocarpa*

Veronica PEREDA, Annegret Kohler, Marc Buée, Damien Blaudez, Michel Chalot and Francis Martin

UMR 1136 INRA/Nancy Université Interactions Arbres/Micro-organismes, INRA Nancy, 54280 Champenoux, France.

Author for correspondence:

Francis Martin Tel: (33) 383 39 40 80 Fax +33 383 39 40 69

Email: fmartin@nancy.inra.fr

Summary

Sequencing of the *Populus trichocarpa* genome creates an opportunity to describe gene networks involved in Pi acquisition and homeostasis of a woody perennial species able to form mycorrhizal symbioses. Members of the PHT1 gene family play a key role in high affinity inorganic phosphate (Pi) transport. Here, we describe features of the 12 genes coding for the PHT1 transporters identified in the genome of *P. trichocarpa*, their evolutionary history and expression during major developmental stages (endo- and ectomycorrhizal symbiosis, senescence) and growth on Pi-depleted medium. Pi starvation triggered the upregulation of most members of the *Pht1* family; *PtrPht1;9* and *PtrPht1;11* showed the highest upregulation. At least five PHT1 transporters were upregulated in senescing leaves. *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12* showed a striking upregulation in ectomycorrhizas, whereas *PtrPht1;10* was the only transcripts induced in endomycorrhizal roots. The present data suggest that individual PHT1 transporters may play a specific role in acquiring and translocating Pi in the different poplar tissues. This study provides a better understanding of the role this family plays in Pi uptake and partitioning in a perennial woody species as well as its evolutionary development. Poplar has developed adaptative mechanisms to cope with limiting concentrations of Pi available in forest soils through increased Pi uptake and fine tuning of the differential expression of the *PHT1* family members in symbiosis.

Key words: Phosphate transport, mycorrhiza, expression analysis, transcriptome, immunolocalisation, *Populus trichocarpa*.

Introduction

Phosphorus is required for most plant processes, being essential for development and metabolism. The primary source of phosphorus for plants is inorganic orthophosphate (Pi). Since Pi is often present in limited amounts in soils, it represents the second most frequently limiting factor for plant growth in a variety of natural ecosystems (Marschner, 1995; Poirier and Bucher, 2002; Misson, *et al.*, 2004; Requena, 2005). Pi concentration in the soil solution hardly reaches 1 mM in forest soils and may even drop to μM levels at the root/soil interface, where a depletion zone is generated by Pi uptake of plants and rhizospheric microorganisms (Poirier and Bucher, 2002).

This has led in the evolution in plants of a series of adaptive morphological and biochemical strategies that increase the acquisition of Pi and/or improve the efficiency of internal partitioning of Pi (Smith and Read, 1997). Specific transport systems are essential for the uptake of Pi and for its partitioning within plants (Poirier and Bucher, 2002). Pi absorption and transport inside plant organs are complex and poorly understood mechanisms. Kinetic studies have shown the co-existence of two transport systems with low or high affinity for Pi (Dunlop *et al.*, 1997; Misson, *et al.*, 2004). Formation of mycorrhizal symbiosis is another major plant strategy that evolved for improving Pi acquisition. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi colonize root systems of most land plants and modulate plant growth by enhancing the availability of nutrients, in particular, Pi for plant nutrition, by forming far-reaching extraradical mycelia which operate as functional extensions of the plant root system (Paszkowski, *et al.*, 2002; Karandashov, *et al.*, 2004). In addition, ectomycorrhizal fungi secrete enzymes able to hydrolyze soil organic P compounds that are normally unavailable to AM mycorrhizas or nonmycorrhizal roots (Marschner and Dell, 1994).

Our knowledge of Pi transport and homeostasis in higher plants has been extended in recent years by thorough molecular analysis of membrane transporters involved in Pi uptake into cells (Rausch and Bucher, 2002; Smith *et al.*, 2003; Bucher, 2006). Transport of Pi through plant membranes is mediated by a number of families of transporter proteins. The PHT1 family,

comprising nine members in the *Arabidopsis* genome, includes proteins involved in the uptake of Pi from the soil solution and the redistribution of Pi within the plant. Members of this family are $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}^+$ symporters (Bucher *et al.*, 2001). Most of the genes of the PHT1 family that are expressed in roots are up-regulated in P-stressed plants (Mudge *et al.*, 2002).

The Pi partitioning and recycling within the plant require Pi membrane transporters, including a number of members of the PHT1 family (Mudge *et al.*, 2002), together with at least one member of another family of Pi transporters, the PHT2 family (Daram *et al.*, 1999). The PHT2 family has similarities to some mammalian Na^+ /phosphate cotransporters, but functions as a $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ cotransporter in plants. The members of the PHO1 family, which comprises 11 genes in the genome of *Arabidopsis*, has recently been identified as proteins involved in the loading of Pi into the xylem of roots in *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2004).

The aim of this study was to establish a comprehensive genome-wide inventory of Pi transporters of the PHT1 family (TC 2.A.1.9) in *Populus trichocarpa* cv. Nisqually. PHT1 transporters are homologues of the yeast PHO84 Pi transporter and they belong to the major facilitator superfamily of proteins (Pao *et al.*, 1998). The release of the genome sequence of this perennial species (Tuskan *et al.*, 2006) and the presence of an extensive expressed sequence tag (EST) database enabled genome screening and identification of *PHT1* transporter genes and transcripts. We identified 12 *PHT1* genes whose products present homology with known *PHT1* sequences. Genome organisation and evolutionary history of these *PHT1* genes is described along with the expression in various tissues, including endomycorrhizal and ectomycorrhizal symbioses, and the regulation of gene expression during senescence and upon Pi starvation.

Results

Annotation and distribution of Poplar Pht1 genes

Twelve gene models coding for putative PHT1 transporters were identified in the JGI predicted gene catalog resulting from the automated annotation of the *P. trichocarpa* JAZZ genome

assembly (v1.1). The sequences of the curated set of *PHT1* genes were named *PtrPht1*;1 to *PtrPht1*;12 (*Populus trichocarpa* Pi transporter Family 1) according to (Karandashov, *et al.*, 2004). ESTs have been reported for these 12 PHT1 transporters (Table 1). These twelve putative *Pht1* genes were located on scaffolds 125, 197 and 273 and mapped to linkage groups (LG) I, II, V and X (Supplementary Fig.1). *PtrPht1*;4 and *PtrPht1*;7, sharing 98% sequence similarity, are closely located (Supplementary Table 2) suggesting that they constitute a tandem duplication. On the other hand, *PtrPht1*;4/*PtrPht1*;7, *PtrPht1*;6 and *PtrPht1*;11 are located on LG V but they do not constitute a cluster as they are scattered over 4 Mbp.

Primary and secondary structure

All putative poplar PHT1s contained 12 transmembrane domains (TM), separated in two blocks of six TM spanners by a long hydrophilic loop, and hydrophilic N and C termini as was predicted by TopPred (Claros and von Heijne, 1994) (Supplementary Figure 2a and 2b). ScanProsite (Gattiker *et al.*, 2002) identified the sequence signature of the Major Facilitator Superfamily (MFS) proteins in PHT1 sequences belonging to subfamily II (12, 9 and 13 members in *Populus*, *Arabidopsis* and *Oryza*, respectively). Membrane proteins belonging to this very old and large MFS superfamily contain 400 to 600 amino acid residues and exhibit either 12 or 14 putative transmembrane α -helical spanners (Pao, *et al.*, 1998). The TM10 domain of *PtrPht1*;10 shared a high similarity with the WW domain signature, also known as rsp5 or WWP, between amino acids 400 to 425, as it was reported for *LePT4* and *StPT4* (Nagy *et al.*, 2005). Multiple sequence alignment of poplar PHT1s and *LePT4*, *StPt4*, *StPt3*, *MtPt4*, and *OsPt11* showed several well conserved regions only for the induced mycorrhiza-specific genes and *PtPht1*;8 and *PtrPht1*;10. Eight out of twelve *PtrPht1* genes are intronless, while there are only three out of nine intronless *Pht1* genes in *Arabidopsis* (Fig.1).

Phylogenetic analysis of PHT1 genes

A NJ tree was constructed using a multiple sequence alignment of *P. trichocarpa* PHT1 proteins and sequences from other fungal and plant Pi transporters to investigate their evolutionary

history. In plants, four PHT1 subfamilies were identified (Fig. 2). Subfamily II clustered only members of monocot origin, whereas subfamily III grouped PHT1 proteins solely from dicotyledonous species. Subfamilies I and IV included members from both monocot and dicot species suggesting that they are evolutionarily older than subfamilies II and III. Recent findings indicate the presence of two endomycorrhiza-inducible Pi transporters in solanaceous plant species (i.e. *LePT3/LePT4* in tomato, and *StPT3/StPT4* in potato, respectively; (Nagy, *et al.*, 2005). In rice and alfalfa, a single Pi transporter was expressed in an endomycorrhiza-specific way (Paszkowski, *et al.*, 2002). It appears that *P. trichocarpa* harbors two non-orthologous endomycorrhiza-inducible *Phl1* genes, *PtrPhl1;8* and *PtrPhl1;10*, which belong to subfamily I. While members of subfamily I exhibit endomycorrhiza-specific regulation, *StPT3* is an endomycorrhiza-upregulated gene that it is also expressed in non-mycorrhizal roots and leaves (Rausch, *et al.*, 2001; Nagy, *et al.*, 2005). *PtrPhl1;3* appears to be very close related to *StPT3*, the first endomycorrhiza specific plant Pi transporter to be identified.

Analysis of the promoter sequences

The *PtrPhl1;9* and *PtrPhl1;11* promoter regions up to 2.4 kb upstream of their respective initiator ATGs were analyzed for putative cis-regulatory elements using FOOTPRINTER 2.0. This analysis showed the presence of 16 well conserved motifs (Parsimony score: 0; significance level of 1.07). The same analysis was made for *PtrPhl1;10* including *MtPT4* and *StPt4* available promoter sequences and we found thirteen motifs but only three with a significance level of 1.16 and parsimony score of 0 (motifs: TGTATTGATTTT, GTATTGATTTT and ATTTTAAAAAA). Manual scanning also revealed the presence of a motif (CAATTATTT at -1049) very close to the motif reported in *StPT3* (CAATTATTG-1227), a dyad-symmetric sequence for *in vitro* binding of the Athb-1 homeodomain-leucine zipper domain (Rausch *et al.*, 2001). *PtrPhl1;8* did not present any motif with a significance level acceptable when compared to *PtrPhl1;10*, *MtPT4* and *StPt4* promoter sequences. Using the PLACE program (Higo *et al.*, 1999), we found that nine out of the twelve *PtrPhl1* presented the P1BS motif (GNATATNC) (Rubio, *et al.*, 2001; Schunmann, *et al.*, 2004) in their 5'-upstream sequence. Only *PtrPhl1;6*,

PtrPht1;8 and *PtrPht1;9* did not present the P1BS motif within 2400 nt upstream the translating start ATG.

PHT1;1, PHT1;4 and PHT1;10 genes encode phosphate transporters

The transport activities of *PtrPht1;1*, *PtrPht1;4* and *PtrPht1;10* were assayed in the yeast phosphate transport mutant PAM2 (Martinez and Persson, 1998). PAM2 lacks PHO84 and a high-affinity, sodium-coupled transporter, PHO89. To determine whether the selected poplar *PHT1* genes encode a functional phosphate transporter and to analyze the phosphate transport activity of this protein, the *PtrPht1;1*, *PtrPht1;4* and *PtrPht1;10* cDNAs were cloned into a yeast expression vector, pYES2, under the control of the *Lac* promoter. The resulting plasmids were introduced into PAM2. PAM2 transformants carrying *pYES2-PtrPht1;1*; *pYES2-PtrPht1;4* and *pYES2-PtrPht1;10* displayed an increase in phosphate uptake relative to the yeast strains carrying pYES2 (data not shown). In these strains, phosphate transport followed Michaelis-Menten kinetics (data not shown). The PAM2 strain expressing *PtrPht1;10* showed an apparent K_m of $1058 \pm 79 \mu M$.

PHT1 gene expression in poplar tissues

Using quantitative reverse transcriptase PCR, we examined the expression profile of the twelve putative *Pht1* transporters of *P. trichocarpa* in adventitious roots, xylem, leaves, female and male inflorescences, and during budbreaking and senescence (Fig. 3). Tissue were harvested either from plants grown in fertilized medium or sampled on an adult tree (senescing leaves).

Considering the high sequence similarity (98%) of *PtrPht1;4* and *PtrPht1;7*, it was not possible to design specific PCR primers for the corresponding transcripts. The latter showed the highest levels in most tissues analyzed. In nonmycorrhizal adventitious roots, *PtrPht1;1*, *PtrPht1;2* and *PtrPht1;4/PtrPht1;7* showed the highest expression, whereas *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12* were lowly expressed. In stem tissues, all *Pht1* transcripts, except *PtrPht1;8*, *PtrPht1;10*, *PtrPht1;11*, were found expressed but a very low level. During budbreaking, *PtrPht1;4/PtrPht1;7* were the most highly expressed *Pht1s*; their transcripts showing a higher level in stage 2 (emerging

leaves) than in stage 1 (buds) and stage 3 (expanding leaves). In mature leaves, *PtrPht1;3*, *PtrPht1;9*, *PtrPht1;12*, were also detected at a moderate level. In female and male inflorescences, only *PtrPht1;1* and *PtrPht1;4* were expressed.

Expression of the *Pht1* genes is regulated by Pi availability

Three different genotypes of *Populus* with different sensibilities to Pi depletion were tested in order to analyze the regulation of *Pht1* genes in adventitious roots. The *P. trichocarpa* cv. 101-74 and *P. deltoides* cv. 54B14 genotypes corresponded to the parents of the hybrid clone *P. deltoides* $\times$ *trichocarpa* B060-283 used here. *P. deltoides* was highly affected by Pi starvation showing a low growth rate and a high number of necrotic spots on leaves, whereas the genotype *P. deltoides* $\times$ *trichocarpa* B060 presented a high growth rate during Pi starvation and no indication of deficiency on leaves (data not shown). *P. trichocarpa* showed a intermediate sensibility to Pi starvation compared to *P. deltoides* and the hybrid B060-283. Pi starvation triggered the induction of most *Pht1* genes in the three different poplar genotypes (Fig. 4). In *P. trichocarpa*, *PtrPht1;1*, *PtrPht1;9* and *PtrPht1;11* expression was upregulated >10,000-fold, whereas *PtrPht1;2*, *PtrPht1;5*, *PtrPht1;6*, *PtrPht1;7*, and *PtrPht1;12* showed a 10-fold induction. In *P. deltoides*, the homologs of *PtrPht1;5* was found upregulated by >100-fold, whereas other homologs were moderately upregulated ~10-fold. In the hybrid B060-283, the homologs of *PtrPht1;9*, *PtrPht1;11* and *PtrPht1;12* presented transcript levels 10,000 to 100,000 fold higher than in control plants. *PtrPht1;11* is the homologue of *AtPht1;8* and *AtPht1;9*. It has been showed that these genes were strongly upregulated during Pi starvation. Finally, expression of *PtrPht1;8* and *PtrPht1;10* was not detected in control- and Pi-depleted roots in any genotypes.

Mycorrhizal symbiosis regulates *PHT1* expression

To determine which of the *PHT1* transporters are transcriptionally induced upon mycorrhizal colonization, gene-specific primers and probes were designed, and quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to monitor transcript levels for every Pi transporter gene in both ectomycorrhizal (*Laccaria bicolor*) and endomycorrhizal (*Glomus intraradices*) roots.

Ectomycorrhizal symbiosis. *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12* showed a very high upregulation (× 20- and 35-fold, respectively) in ectomycorrhizal root tips compared to non-mycorrhizal roots (Fig.6). By contrast, *PtrPht1;1* and *PtrPht1;11* showed a reduced transcript level in ectomycorrhizas. *PtrPht1;8* and *PtrPht1;10* transcripts were not detected in nonmycorrhizal- and ectomycorrhizal root tips. This finding was observed repeatedly in three independent experiments.

Endomycorrhizal symbiosis. *PtrPht1;8* and *PtrPht1;10* are homologues of the known endomycorrhiza-inducible Pi transporters (subfamily III). In *P.trichocarpa/G.intraradices* mycorrhizal roots, transcripts coding for *PtrPht1;8* were not detected, whereas *PtrPht1;10* were only found in this symbiotic tissues (data not shown) (Figure 7). The endomycorrhizal symbiotic structures differentiate within cortical cells but remains separated from the cytoplasm of the host plant cell by an extension of the plant plasma membrane, called the periarbuscular membrane. In *Medicago truncatula*, this periarbuscular membrane hosts the MtPT4 endomycorrhiza-specific phosphate transporter involved in the uptake of Pi released by the AM fungus (Harrison *et al.*, 2002). To determine whether PTRPHT1;10 is located on the plant membranes surrounding the intracellular *G. intraradices* colonizing mycelium, mycorrhizal roots were hand sectioned, fixed, and stained with the PTRPHT1;10 antibody. In poplar, an intermediate *Arum- Paris*-type pattern of mycorrhiza formation occurred with arbusculate coils and coiled hyphae that occasionally ramified in finger-like structures (Figure 7A). The anti-PTRPHT1;10 antibody was detected with a secondary antibody conjugated to AlexaFluor 488, and the sections were counterstained with a wheat germ agglutinin WGA–Alexa 633 conjugate to expose the fungus. Confocal laser scanning microscopy was used to examine the symbiotic structures. Figure 7B shows the images of two cortical cells colonized by *G. intraradices* intraradicular mycelium. The individual branches of the coiled hyphae were clearly visible (Figures 7B), and the PTRPHT1;10 signal colocalized with the symbiotic structures filling the cells. The signal appeared strongest around the mycelial branches (Figure 7B). No signal was detected in noncolonized cortical cells. Control images in which the mycorrhizal root sections were obtained by replacing primary anti- PTRPHT1;10 antibodies

with preimmune immunoglobulin showed no specific fluorescence (data not shown).

Pht1 expression during leaf autumn senescence

The expression of the *PtrPht1* genes was studied in young, mature and senescing leaves collected on October 27th, November 23rd and December 5th, 2006, respectively. The senescing stage of leaves was assessed by measuring the transcript level of a cysteine protease gene (Bhalerao *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004; Couturier *et al.*, 2007). The corresponding transcript was only detected in leaves collected on December 5th (data not shown). Young and mature leaves showed similar transcript levels for all members of the *Pht1* family (Fig. 5). On the other hand, five *PHT1* transcripts (*PtrPht1;1*, *PtrPht1;5*, *PtrPht1;6*, *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12*) were significantly up-regulated (≥ 3 -fold) in senescing leaves by comparison to earlier stages. The highest increase (7.1 and 9.5-fold) corresponded to *PtrPht1;5* and *PtrPht1;6*, respectively.

Discussion

Little is known about how many Pi transporters exist in tree genomes or how many of these play a role in symbiosis-mediated Pi uptake. The completion of the *P. trichocarpa* genome has revealed that the *Pht1* family of phosphate transporter genes contains a total of 12 closely related members. The sequencing of the poplar genome has also revealed the presence of two member of the *Pht2;1* family of phosphate transporters and several members of the *PHO1* gene family (Wang *et al.*, 2004) in this species (Tuskan *et al.*, 2006). The results of this study provide some insight into the roles of the individual PHT1 Pi transporters during tree development and allow identification of the Pi transporters determining the entire network of Pi acquisition and recycling activities. The high number of Pi transporters present in *P. trichocarpa*, including endomycorrhiza- and ectomycorrhiza-induced genes, is likely a reflection of the complexity and significance of the Pi acquisition and cycling processes in this perennial plant for the symbiosis ecophysiological fitness and annual recycling processes. In ectomycorrhizal trees, inorganic orthophosphate (Pi) is the ion translocated from the external soil solution to the host root through the extraradical mycorrhizal network and mantle ensheathing the root tips (Harley &

Smith, 1983). High- and low-affinity phosphate transporters of the fungal partner (s) therefore play a crucial role in symbiosis P metabolism and then, plant nutrition and we have investigated their role in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. The completion of the *L. bicolor* genome sequencing has revealed that the PHT1 family of Pi transporters genes contains a total of five members belonging to two divergent evolutionary clades and we have showed that the PHT1 transporter family has expanded in *L. bicolor* by comparison to other sequenced basidiomycetes (Pereda *et al.*, 2008). The transcript levels of *LbPht1;2*, *LbPht1;3* and *LbPht1;4* were increased up to 30-fold, whereas *LbPht1;5* expression was upregulated 256-fold in ectomycorrhizal root tips of poplars grown on Pi-depleted medium (Pereda *et al.*, 2008). It remains to be determined how the host plant and its mycobiont coordinate their Pi acquisition and metabolism.

In the present study, we have establish a comprehensive genome-wide inventory of Pi transporters of the PHT1 family in *Populus trichocarpa* cv. Nisqually. We identified 12 *PHT1* genes whose products present homology with known *PHT1* sequences. We estimated the phylogenetic relationship between poplar PHT1s and fungal and monocotyledonous and dicotyledonous Pi transporter proteins (Fig. 2). Four main groups of plant Pi PHT1 transporters were inferred. Genes from mono- and dicotylenous plants are found in two main groups (subfamilies II and III), indicating their evolutionary divergence before the common ancestor of monocots and dicots. A third group, subfamily I, clustered the endomycorrhiza-induced Pi transporters from both monocots and dicots. Finally, a fourth highly divergent group, subfamily IV, was also identified; it included the poplar ectomycorrhiza-upregulated PHT1s. Within each subfamily, predicted PHT1 proteins are highly homologous to each other in structure and sequence, but their differential expression patterns in response to developmental stages, Pi starvation and mycorrhizal interactions hinted at functional diversification. Members of subfamily III are restricted to dicots, whereas PHT1 of subfamily II appear to be restricted to monocots. Phylogenetic analysis also suggested that endomycorrhiza-inducible PHT1 of subfamily I are evolutionarily older than subfamilies II and III. The fact that all poplar members

of subfamily III are intronless, except *PtrPht1;3* suggests that they were generated from a common ancestral sequence. Conservation of different intron-exon structures strongly suggest divergent evolutionary histories for the different PHT1 subfamilies. Tandem duplications are clearly an important mechanism generating new gene copies in *P. trichocarpa* (Cannon *et al.*, 2004). *PtrPht1;9/PtrPht1;11*, *PtrPht1;4/PtrPht1;7*, and *PtrPht1;1/PtrPht1;2* are likely recent duplications. Gene duplication has been followed by changes in expression levels and regulation of paralogous pairs.

To determine the tissue and developmental specificity of poplar PHT1 expression, mRNA was examined at various stages in roots, leaves, stems, as well as male and female inflorescences. Paralogous *PHT1* genes differed in their level of transcriptional control. *PtrPht1;4/PtrPht1;7* showed a high level of expression in leaf and root tissues comparing to other *Pht1* genes (Fig. 3). The transcripts encoding for *PtrPht1;1*, *PtrPht1;5*, *PtrPht1;6*, *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12* showed a strong induction (>4-fold) in the oldest leaves, which are starting to senesce (Fig. 5), suggesting that they play a key role in Pi remobilization during leaf tissue degradation. These transporters may be involved in the redistribution of Pi out of old leaves (where it is no longer required), and up down the sink in the perennial tissues. At least one senescence-associated RNase gene is known in poplar (Andersson *et al.*, 2004), and this activity would generate additional Pi for remobilisation out of these old leaves.

P. trichocarpa produces longer and more dense roots under low Pi conditions (data not shown). It is worth noting that the Pi-depleted roots assayed in the present study were grown in sandy soil and therefore the results obtained here may more accurately reflect the situation found in the field. At the molecular level, *PtrPht1;9* and *PtrPht1;11* showed a dramatic upregulation (>1,000,000-fold) upon Pi starvation (Fig. 4); their orthologs in the hybrid *P. trichocarpa x deltoides* also showed a striking upregulation. *Pht1;1* also showed a striking induction, 100- to 10,000-fold, upon Pi depletion in *P. trichocarpa x deltoides* and *P. trichocarpa*, respectively. These PHT1 transporters likely play a scavenger role within the *PHT1* gene family. P1BS-like elements were present in the promoters of a range of Pi-regulated genes in dicots and

monocots. In *Arabidopsis*, the MYB transcription factor PHR1 (At4g28610) binds to the P1BS element and regulates the Pi starvation response (Rubio *et al.*, 2001). An ortholog of this MYB transcription factor (JGI Protein ID: 711538), sharing 57% of similarity with PHR1 protein, was found in the *P. trichocarpa* draft genome.

Using a genome-wide approach, we asked how many transporter genes contribute to symbiotic phosphate uptake and analyzed their evolutionary conservation. The deduced protein sequences of the 12 putative phosphate transporters of the *Populus trichocarpa* Pht1 family were aligned with all the available protein sequences of the endomycorrhiza-inducible phosphate transporters (mycPTs) and the PHT1 from *Arabidopsis*, *Oryza*, *Solanum*, and *Lycopersicon* (Paszowski *et al.*, 2002; Rae *et al.*, 2002; Rausch *et al.*, 2001; Karandashov and Bucher, 2005; Nagy *et al.*, 2005). The phylogenetic analysis showed that PtrPHT1;10 is closely related to the clade of the endomycorrhiza-inducible phosphate transporters of the solanaceous species in the subfamily III. *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12* showed a striking upregulation in ectomycorrhizal root tips (Fig. 6), while *PtrPht1;10* is only induced in endomycorrhizal roots, suggesting that the latter PHT1s may have evolved with the symbiotic lifestyle. Immunocytolocalization using anti-PtrPHT1;10 antibody demonstrated that this transporter protein was exclusively accumulating around the symbiotic mycelial structures developed by *G. intraradices* mycelium in colonized cortical cells. The transporter was not detected in non colonized root cells.

The phylogenetic tree demonstrates that another PHT1 transporter of *P. trichocarpa*, PtrPHT1;8, clusters with members of the subfamily III, and is related to the endomycorrhiza-inducible phosphate transporters of the other plant species (Fig. 2). The phylogenetic distance between PtrPHT1;8 and the other mycPTs is larger than that between PtrPHT1;10 and the other mycPTs. Moreover, quantitative RT-PCR of *PtrPHT1;8* transcripts showed that this transporter is not induced in endomycorrhizal roots. Within the subfamily II, six PHT1 transporters from *P. trichocarpa* were identified, including *PtrPHT1;3* which clustered with the endomycorrhiza-inducible StPT3 of *Solanum tuberosum* (Rausch *et al.*, 2001; Karandashov and Bucher, 2005; Nagy

et al., 2005). Quantitative RT-PCR revealed that *PtrPHT1;3* was expressed at low levels in stem, root and leaf tissues, but an induction upon ecto- or endomycorrhizal colonization was not observed. Interestingly, ectomycorrhiza development led to the upregulation of two other PHT1 transporters, *PtrPht1;9* and *PtrPht1;12*, suggesting that different signaling pathways are controlling Pi uptake in these mycorrhizal symbioses. Although the drastic accumulation of *PtrPht1;8*, *PtrPht1;9*, *PtrPht1;10* and *PtrPht1;12* transcripts upon mycorrhizal colonization could be symbiosis specific, it also may be a secondary effect of the enhanced Pi supply, in this case, provided by the fungus. To distinguish between mycorrhiza-induced *PtrPht1* regulation by nutritional or fungus-specific signals, we examined *PtrPht1* mRNA levels in poplar plantlets grown on Pi depleted medium. *PtrPht1;8*, *PtrPht1;10* and *PtrPht1;12* were not responsive to Pi availability, whereas there were responsive to mycorrhiza interaction. Thus, activation of these symbiosis-regulated genes is not mediated by Pi availability or the nutritional P status of the plant. Our results showed that at least four poplar Pi transporters are involved in acquiring Pi via endo- and ectomycorrhizal fungi, emphasizing the complexity of Pi acquisition in perennial trees with access to several symbiotic and nonsymbiotic Pi uptake pathways. Various genes for symbiosis-mediated Pi uptake into plants have arisen during *Populus* evolution.

This study opens up the characterization of Pi transporters from a perennial plant and provides a survey of the complete assortment of PHT1 proteins in this species. The results of this study suggest that members of the PHT1 family of Pi transporters are expressed in a diverse range of tissues, and are therefore involved not only in uptake of Pi from the soil solution, but also in many other aspects of Pi translocation within the tree. Poplar is the only species of the collection of plants used for studying endomycorrhizal and ectomycorrhizal symbioses, and Pi nutrition suitable for a genome-wide approach, and further exploitation of this system should substantially contribute to a better understanding of the intermingling signalling pathways involved in Pi acquisition and symbiosis development.

Materials and Methods

Plant growth conditions

Most experiments were performed on cuttings of *Populus trichocarpa* (clone INRA 101-74). Poplar cuttings (10 cm length, 1 cm diameter) were planted into pots containing sterile, acid-washed sand and were watered with deionized water and fertilized twice weekly with the following solution: 7.91 mM KNO₃, 7.9mM Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 2.69mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 3mM MgSO₄ · 7H₂O and 0.2 ml of a trace-element stock solution (Kanieltra Co.), pH 6. When needed, plants were then fertilized with a Pi-free nutrient solution. In order to maintain Na⁺⁺ at a constant concentration, NaH₂PO₄ · 2H₂O was replaced by NaCl. Plants were provided with 16 h of light (natural sunlight supplemented with metal halide lamps; light intensity: 1070 mE/m²/s) daily and 60% relative humidity. Greenhouse temperature was maintained at 21°C to 23°C during the day and 14°C to 18°C at night. All experiments were independently repeated five times, using a new batch of plants for each experiment. Each sample represented a plant material pool from at least three plants. Adventitious roots were collected after two months of Pi starvation, immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for further analysis. Roots were inspected under a compound microscope to ensure the absence of ecto- and endomycorrhiza.

Mycorrhizal inoculation of *Populus trichocarpa* for the Pi starvation experiment

Alginate beads including mycelia of *L. bicolor* S238N were obtained using the method of (Mortier, *et al.*, 1989) and were then mixed into sterile, acid-washed sand (1:20 v:v). Alginate beads without any mycelium were used for mocked inoculation. Experiments were performed on cuttings of *Populus trichocarpa* (clone INRA 101-74). Fertilization and greenhouse conditions were performed as above. Ectomycorrhizal root tips (about 20 tips for each sapling) were collected after two months of Pi starvation, immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for further analysis. After morphotyping, ITS sequencing was performed in order to confirm the identity of *L. bicolor* ectomycorrhizas and exclude possible contaminations of other very competitive ectomycorrhizal fungi, such as *Thelephora terrestris*.

Inoculation of plants with *Glomus intraradices*

G. intraradices was grown in aseptic conditions according to Buée *et al.* (2002). For plant inoculation, equal volumes of medium either containing 1,000 spores or without fungal spores (mock) were added to the agar-grown *P. trichocarpa* hairy roots.

In vitro production of ectomycorrhiza

250 ml Erlenmeyer flasks were filled with 200 ml of perlite. After addition of 30 ml liquid modified Melin Norkrans medium (MMN), the erlenmeyer flasks were autoclaved. *Laccaria bicolor* S238N mycelium was pre-cultured on agar plates containing MMN medium. Small pieces of mycelium-covered agar were added under sterile conditions to the flasks. The flasks were then kept in a controlled environment growth chamber (17h photoperiod at $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 25°C). At the same time *P. tremula x alba* (INRA clone 717-1B4) cuttings were placed in glass tubes containing 15 ml of Murashige & Skoog (MS) agar and transferred to the growth chamber as well. About one month later the well-rooted plantlets were transferred under sterile condition into Erlenmeyer flasks containing perlite-grown mycelium. Then, the flasks were placed back into the growth chamber and checked after 3 weeks for mycorrhiza development.

Bud and leaf samples

Budbreak and comparative leaf emergence stages were determined by assigning each sample a number between 0 (no budbreak) and 5 (full leaf emergence). Photos of the different budbreak stages are available at: <http://mycor.nancy.inra.fr/>. To follow the effect of the seasonal senescence on the PHT1 gene expression, leaves were sampled on an adult *P. trichocarpa* growing on the campus of University of Nancy I (Couturier *et al.*, 2007). Twenty leaves were sampled at 2.00 pm for every time point. All samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Computational Identification and Characterization of Poplar PHT1 Transporters

Phosphate PHT1 transporters were identified using three approaches. (1) known PHT1 protein sequences from *Arabidopsis* and other plants (*e.g.*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Lycopersicon esculentum*) were used to query the *P. trichocarpa* JGI gene catalog using BLASTP. (2) These plant PHT1 sequences were also used in TBLASTN query against the JAZZ sequence assembly (Tuskan *et al.*, 2006). (3) Gene models with a predicted phosphate permease domain (IPR004738) were identified using InterProScan (Zdobnov & Apweiler, 2001) and ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>). All detected *PHT1* gene models were inspected manually and edited when required. Throughout the paper, JGI protein identification (ID) was used to identify these gene models. The final set of PHT1 proteins comprised the following: PtrPHT1;1 (JGI Protein ID: 658370), PTRPHT1;2 (JGI Protein ID: 588955), PtrPHT1;3 (JGI Protein ID: 788248), PTRPHT1;4 (JGI Protein ID: 831623), PTRPHT1;5 (JGI Protein ID: 754183), PTRPHT1;6 (JGI Protein ID: 651389), PTRPHT1;7 (JGI Protein ID: 559687), PTRPHT1;8 (JGI Protein ID: 784338), PTRPHT1;9

(JGI Protein ID: 550732), PTRPHT1;10 (JGI Protein ID: 277480), PTRPHT1;11 (JGI Protein ID: 206832), and PTRPHT1;12 (JGI Protein ID: 174800).

Prediction of putative transmembrane segments (TM) for PHT1s was performed using several programs: TMHMM, TM pred, Top Pred and prodiv-TMHMM (Hofmann and Stoffel, 1993; Claros and von Heijne, 1994; Viklund and Elofsson, 2004).

For the phylogenetic tree construction, full-length amino acid sequences were aligned by CLUSTALX (version 1.83.1) (Jeanmougin, *et al.*, 1998) using default settings. The Neighbour-Joining (NJ) tree was generated by CLUSTAL X using default settings. The phylogenetic analysis was also performed using PAUP* Maximum Parsimony (Swofford, 1999) with similar results. All characters were treated as unordered and with equal weight. Other sequences retrieved from NCBI GenBank were: LePT5 (AY885653); StPT5 (AY885654); StPT4 (AY793559); StPT3 (AJ318822); MtPT1 (022301, SP); MtPT2 (022302, SP); MtPT4 (AY116210); OsPT11 (AF536971); LePT4 (AY885651), LePT2 (AF022874), and LePT1 (AF022873); NtPT1 (AAF74025); NtPT2 (BAA86070); and StPT1 (Q43650, SP).

RNA isolation and quantitative RT-PCR

About 100 mg of tissues of Pi-starved and non starved plantlets grown in green house or in erlen meyer flasks as well as ectomycorrhizal tips were harvested, ground in liquid nitrogen and the total RNA was isolated using Qiagen RNeasy minikit (Bio-Rad, France). RNA samples were treated with DNase for 15 minutes at room temperature and 600 ng of total RNA were used for the Retro Transcription reaction using iScript system (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions. Two microliters of RT products were amplified by PCR in 1x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France) with 0.3 mM of specific 5'- and 3'- primers designed for the twelve *P.trichocarpa* *Pht1* family members. Specificity of these primers has been confirmed by Blast search on the *P.trichocarpa* genome (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) and sequencing of RT-PCR products. The sequence corresponding to qRT-PCR primers are listed in Supplementary Table 1. A cDNA fragment corresponding the constitutively expressed ubiquitin gene was amplified simultaneously and used as control. Cysteine protease (CP) gene was amplified (28 cycles) and used as control of the senescing state of leaves (Couturier, *et al.*, 2007). PCR was always performed in duplicates. At least three independent cDNA preparations were used for analysis. PCR efficiencies were calculated using five dilutions series of first strand cDNA samples. Primers used as controls or for analysis had an efficiency >95%.

Yeast phosphate transport assays

PtrPht1;1; *PtrPht1;4*; *PtrPht1;9* and *PtrPht1;10* poplar phosphate transporter cDNAs were amplified by PCR using primers designed to introduce unique restriction sites at the 5' and 3' ends of each gene. The restriction enzymes used for this purpose are shown on Table 1 of Supplemental Materials. The cDNA fragments were cloned into respective restriction sites of pYES2, creating Pyes2-PtrPht1;1; Pyes2-PtrPht1;4; Pyes2-PtrPht1;9 and Pyes2-PtrPht1;10. The constructs were tested for their ability to complement the phosphate uptake defect of the yeast mutant PAM2 (*Apho89::TRP1 Apho84::HIS3 ade2leu2his3trp1ura3*; Martinez & Pearson, 1998), lacking two high-affinity Pi transporters but harbouring a single low-affinity Pi uptake system operative under Pi-rich conditions, were used for complementation studies with the yeast shuttle vector pYES2, containing Pi transporter cDNAs as described previously (Daram, *et al.*, 1998). Phosphate transport assays were performed as described previously (Ueda and Oshima, 1975). The phosphate uptake experiments were performed with triplicate samples. The apparent *K_m* values reported for PAM2 strains are averages of three replicate experiments.

Antibody preparation and purification

Antibodies specific for the PtrPht1;10 derived peptides 266(5'-H2N-QESDKLSEIRASNNYE-CONH2-3')282 and 328(5'-H2N-QAADVSALEEVYETSR-CONH2-3')344, corresponding to a nonconserved region, both coupled to KLH via disulfide bonds, were raised in rabbits. The antisera and the peptides were obtained from the Custom peptide antibody production program (Eurogentec, Brussels). Recombinant IL-16 (rIL-16His) was used to raise antisera in goats (7). Affinity purified goat anti-IL-16 antibodies were used at an IgG concentration of 0.25 µg/ml in immunoblot experiments.

Immunolocalization of PTRPHT1;10

Immunolocalization was performed essentially as described by (Blancaflor *et al.*, 2001) and (Harrison, *et al.*, 2002) with some modifications. Segments from different *G. intraradices* colonized and nonmycorrhizal *P. trichocarpa* roots were fixed for 2h in 4% formaldehyde and 5% (v/v) DMSO in PME buffer (50 mM Pipes, 5mM MgSO₄, and 10 mM EGTA), pH 6.9. The root segments were embedded in agarose 4% and cut into 50 and 100 mm longitudinal sections with a model 1000 Vibratome (Leica). Sections were retrieved with a brush and carefully transferred onto watch glasses and then were digested in 1% cellulase, 0.01% pectolyase, and 0.1% BSA in PME buffer for 10 min. After digestions, the segments were washed three

times for 5 min each with PME buffer and then incubated in 1% BSA in PBS (135 mM NaCl, 25 mM KCl; and 10 mM Na₂HPO₄), pH 7.5, for one hour. The BSA was removed, and the segments were incubated overnight with PtrPht1;10 antibody (1:100 and 1:500) in PBS containing 0.5% (w/v) BSA. The segments were washed five times in PBS and incubated in the secondary antibody conjugate, a 1:80 dilution of goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor 488 conjugate (Molecular Probes) in PBS for 2 h. After five washes in PBS, the segments were incubated in 0.1 mg/ml wheat germ agglutinin (WGA)-Alexa Fluor 633 (Molecular Probes) in PBS for 30 min, WGA binds to the N-acetoglucosamine acid residues on the hyphal surface allowing the imaging of fungal structures (Genre and Bonfante, 1997) After five more washes in PBS, the sections were mounted in 50% (v/v) glycerol and viewed by epifluorescence and confocal microscopy. A Bio-Rad 1024 ES confocal laser scanning microscope equipped with X40 and X63 (numerical aperture 1.2) was used. The excitation and emission wavelengths for the Alexa Fluor 488 dye were 500 to 550 nm, respectively. The excitation and emission wavelengths for the WGA-Alexa Fluor 633 were 590 to 615nm, respectively. Optical sections were collected at 0.16- to 0.4-mm intervals with Kalman averaging.

Acknowledgements

V.L-P was supported by a PhD fellowship from Conacyt-Conafor (National Council of Science and Technology National Forestry Commission). We would like to thank Dr. Jérémy Couturier (UMR IaM) for providing RNA extracts from poplar tissues, Barbara Montanini (UMR IaM) for her assistance in the yeast complementation assay, Dr. Catherine Bastien (INRA Orléans) for kindly providing *Populus* cuttings, Valérie Legué and Joëlle Gérard (UMR IaM) for technical support on confocal microscopy, and Patrice Vion (UMR IaM) for managing the green-house experiments. This project was supported by grants from European projects POPYOMICS and ENERGYPOPLAR, the Network of Excellence EVOLTREE and the Région Lorraine to FM.

References

- Andersson A, Keskitalo J, Sjodin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandre K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M, Jansson S and Nilsson P. 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol* 5: R24.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Bjorkbacka H, Birve SJ, Karlsson J,

- Gardestrom P, Gustafsson P, Lundeberg J and Jansson S. 2003.** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol* **131**: 430-442.
- Blancaflor EB, Zhao L and Harrison MJ. 2001.** Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* **217**: 154-165.
- Bradshaw H, Ceulemans R, Davis J and Stettler R. 2000.** Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 306-313.
- Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND and May G. 2004.** The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **4**: 10.
- Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D and Chalot M. 2007.** The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytol* **174**: 137-150.
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N and Bucher M. 1998.** Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**: 225-233.
- Dunlop J, Phung H, Meeking R and White D. 1997.** The kinetics associated with phosphate absorption by *Arabidopsis* and its regulation by phosphorus status: . *Aust. J. Plant Physiol* **24**: 623-629.
- Gattiker A, Gasteiger E and Bairoch A. 2002.** ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinformatics* **1**: 107-108.
- Genre A and Bonfante P. 1997.** A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. *Protoplasma* **199**: 30-38.
- Harrison MJ, Dewbre GR and Liu J. 2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T. 1999.** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300.
- Hurkman W and Tanaka C. 1986.** Solubilization of plant membrane proteins for analysis by

- two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **116**: 1209-1218.
- Jeanmougin F, Thompson J, Gouy M, Higgins D and Gibson T. 1998.** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**: 403-405.
- Karandashov V, Nagy R, Wegmuller S, Amrhein N and Bucher M. 2004.** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6285-6290.
- Misson J, Thibaud MC, Bechtold N, Raghothama K and Nussaume L. 2004.** Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol Biol* **55**: 727-741.
- Mortier F, Le Tacon F and Garbaye J. 1989.** Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in a nursery. *Agric. Ecosyst. Environ* **28**: 351-354.
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW. 2002.** Expression analysis suggests novel roles for members of the *Pht1* family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J* **31**: 341-353.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N and Bucher M. 2005.** The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J* **42**: 236-250.
- Pao SS, Paulsen IT and Saier MH, Jr. 1998.** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1-34.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C and Briggs SP. 2002.** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13324-13329.
- Pereda V, Lucic E, Kohler A, Brun A, Martin F. 2008.** Structure and expression profile of the phosphate PHT1 transporter family of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* indicates a broad role in inorganic phosphate acquisition. *New Phytologist*, submitted.

- Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ and Mache-Lerbs S. 2003.** Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol* **51**: 385-399.
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N and Bucher M. 2001.** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**: 462-470.
- Requena N. 2005.** Measuring quality of service: phosphate 'a la carte' by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **168**: 268-271.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A and Paz-Ares J. 2001.** A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133.
- Schunmann PH, Richardson AE, Vickers CE and Delhaize E. 2004.** Promoter analysis of the barley Pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiol* **136**: 4205-4214.
- Smith SE and Read DJ. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. *San Diego, CA, USA: Academic Press*
- Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A and Bork P. 1995.** Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* **369**: 67-71.
- Swofford D. 1999.** PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Taylor G. 2002.** Populus: Arabidopsis for Forestry. Do We Need a Model Tree? *Annals of Botany* **90**: 681-689.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis**

- S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y and Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604.
- Ueda Y and Oshima Y. 1975. A constitutive mutation, *phoT*, of the repressible acid phosphatase synthesis with inability to transport inorganic phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **136**: 255-259.
- Poirier Y and Bucher M (2002) Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. In The Arabidopsis Book, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0024.
<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>

Legends of Figures

Figure 1. Comparison of the intron-exon structure of *Pht1* genes in *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*. Black boxes represent exons and white ones introns.

Figure 2. An unrooted phylogenetic tree of PHT1 transporters. The predicted protein sequences were aligned using CLUSTAL X and the Neighbour-Joining tree was generated by CLUSTALX and edited using FigTree. Accession numbers of the predicted protein sequences are given in the Material & Methods section.

Figure 3. Expression of *P. trichocarpa Pht1* genes in different developmental stages.

Transcript levels of *P. trichocarpa Pht1* genes was determined by qRT-PCR analysis of total RNAs, using specific primers. Transcript levels were normalized to those of an housekeeping-gene (Ubiquitine, Protein ID: 732892). Values are the mean ($\pm$ SD) of three biological replicates. **(a)** Transcript levels in plantlets grown in greenhouse: leaf, roots, stem, petiole, xylem, male and female inflorescences. **(b)** Transcript levels during different stages of budbreaking.

Figure 4. Response of poplar *Pht1* genes to Pi starvation. Transcript levels of *Pht1* genes was determined by qRT-PCR analysis of total RNAs in *P. trichocarpa* 101-74, *P. deltoides* 54B14, and the hybrid *P. trichocarpa x deltoides* B060-283. Transcript levels were normalized to those of the housekeeping gene, ubiquitine (JGI Protein ID: 732892). Values are the mean ($\pm$ SD) of three biological replicates. Note the log scale.

Figure 5. Expression of *P. trichocarpa Pht1* genes upon leaf senescence. Transcript levels of *P. trichocarpa Pht1* genes was determined by qRT-PCR analysis of total RNAs, using specific primers. Transcript levels were normalized to those of the housekeeping gene, ubiquitine (JGI Protein ID: 732892). Values are the Mean ($\pm$ s.d.) of three biological replicates.

Figure 6. Response of poplar *Pht1* genes to ectomycorrhiza formation by *Laccaria bicolor*.

Transcript levels of *Pht1* genes was determined by qRT-PCR analysis of total RNAs, using specific primers. Transcript levels were normalized to those of the housekeeping gene, ubiquitine (JGI Protein ID: 732892). Values are the Mean ($\pm$ s.d.) of three biological replicates.

Figure 7. Immunolocalization of PtrPHT1;10 on symbiotic structures in root cortical cells of *Populus trichocarpa* colonized by the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. (A)

Mycorrhizal structures in poplar roots from the in vitro system. Cortical cells colonized with coiled hyphae, arbusculate coils. (B) Laser scanning confocal microscopy images of transversal 25 μ m sections of *P. trichocarpa*-*G. intraradices* mycorrhizal roots. The root sections were counterstained with WGA-Alexa 633 to visualize *G. intraradices* mycelium. Mycorrhizal roots were probed with anti-PtrPHT1;10 antibodies. The anti-PtrPHT1;10 antibodies were visualized with a secondary antibody conjugated with AlexaFluor 488. CC, cortical cells; CW, cell walls of cortical cells; Sym, *G. intraradices* symbiotic structures;

Figure 1

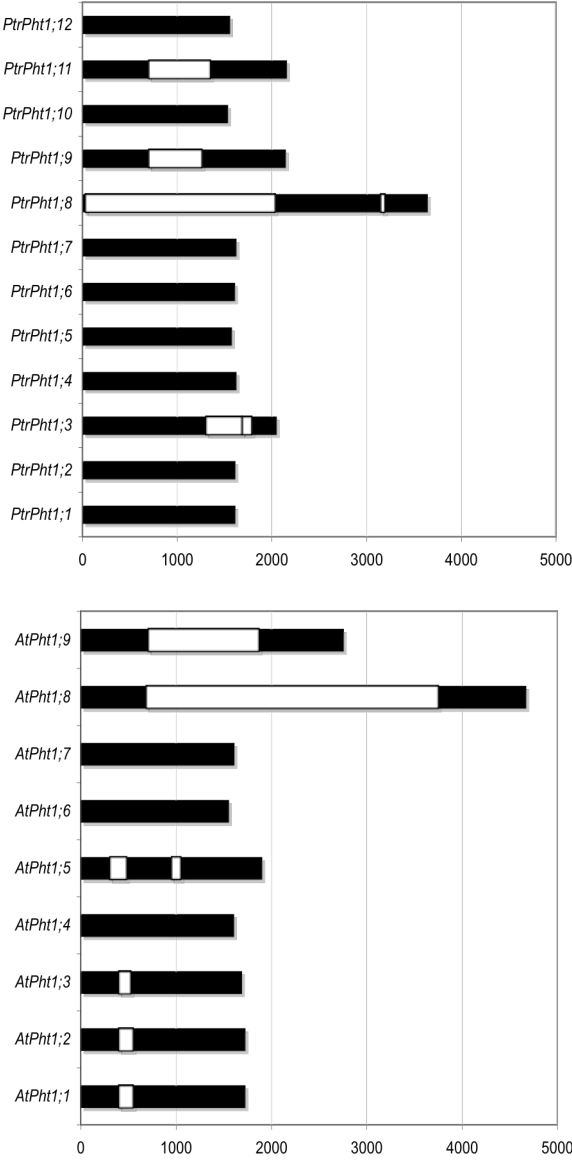


Figure 2.

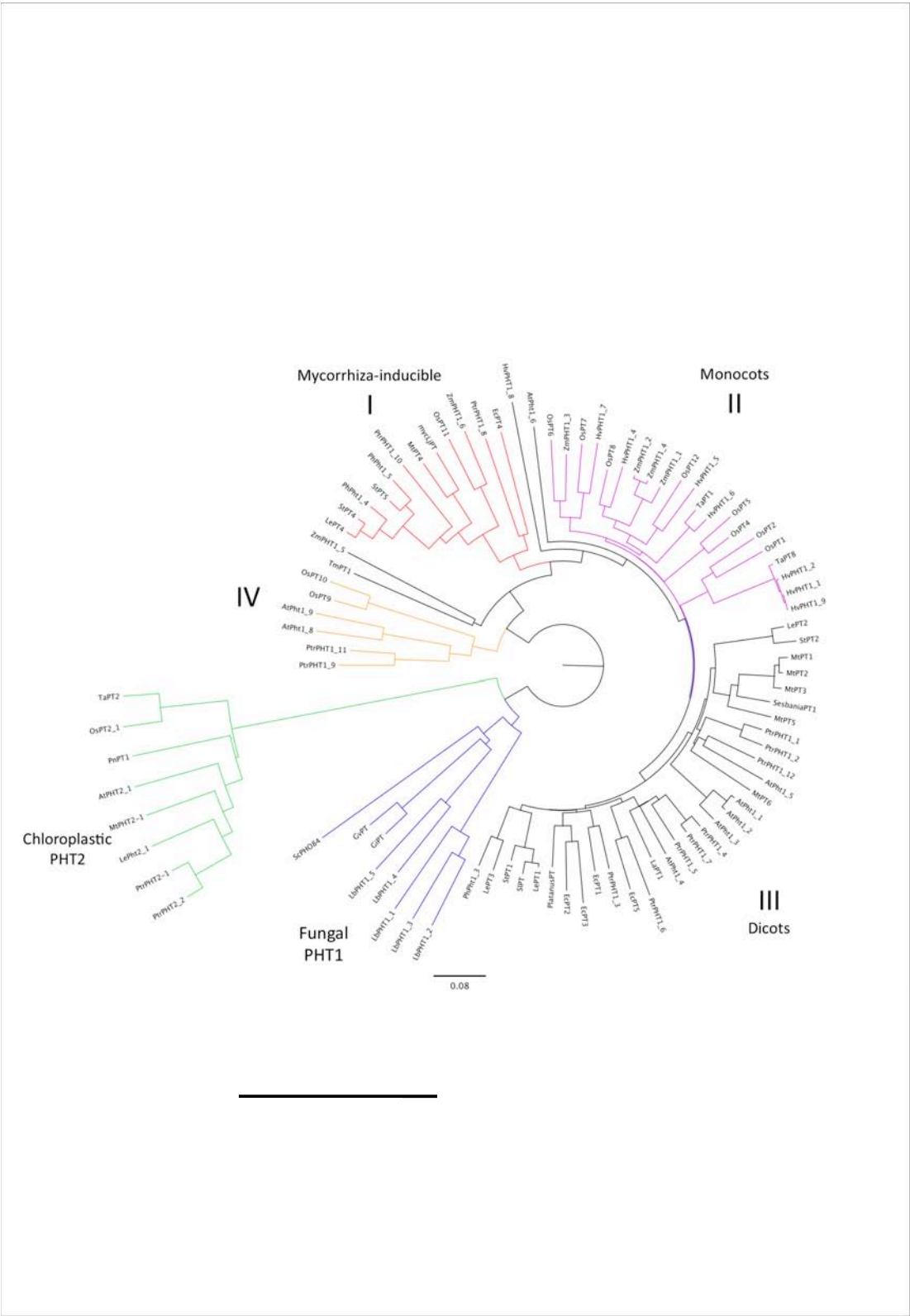


Figure 3.

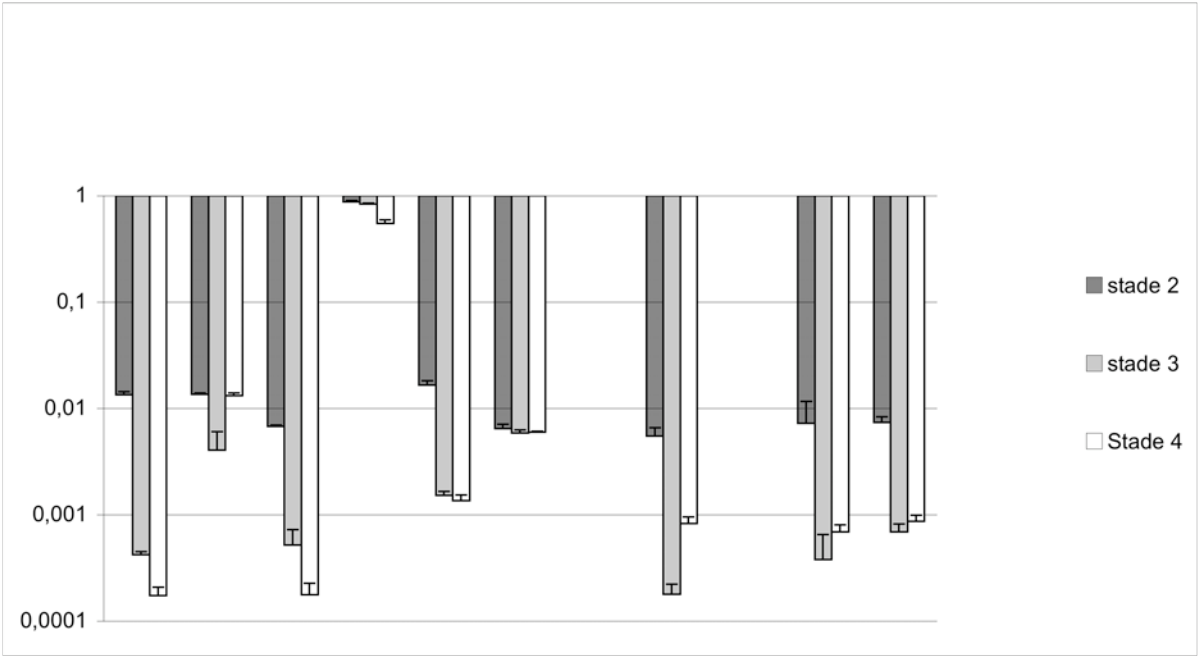
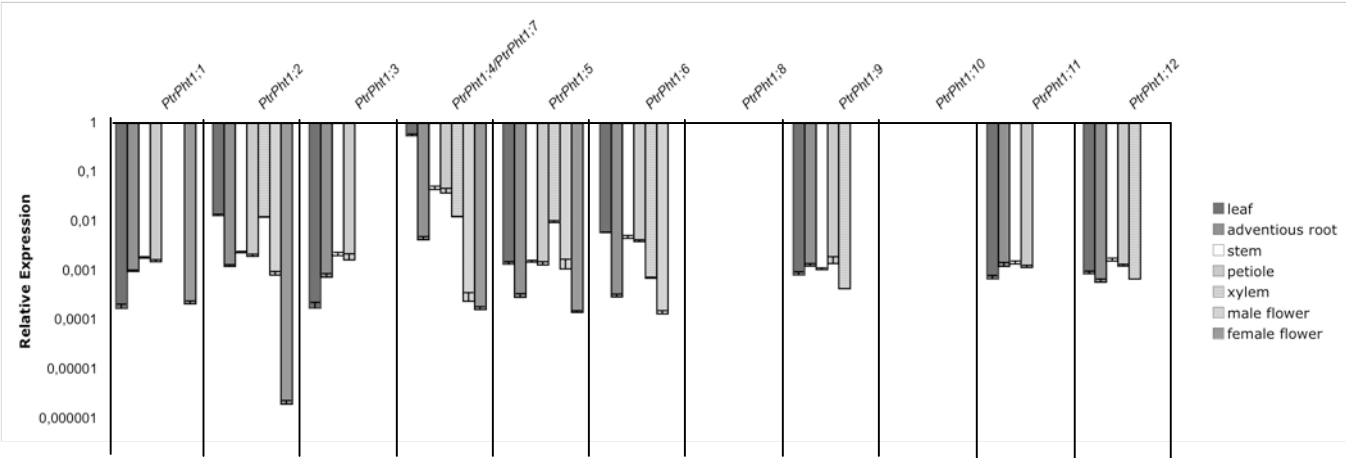


Figure 4.

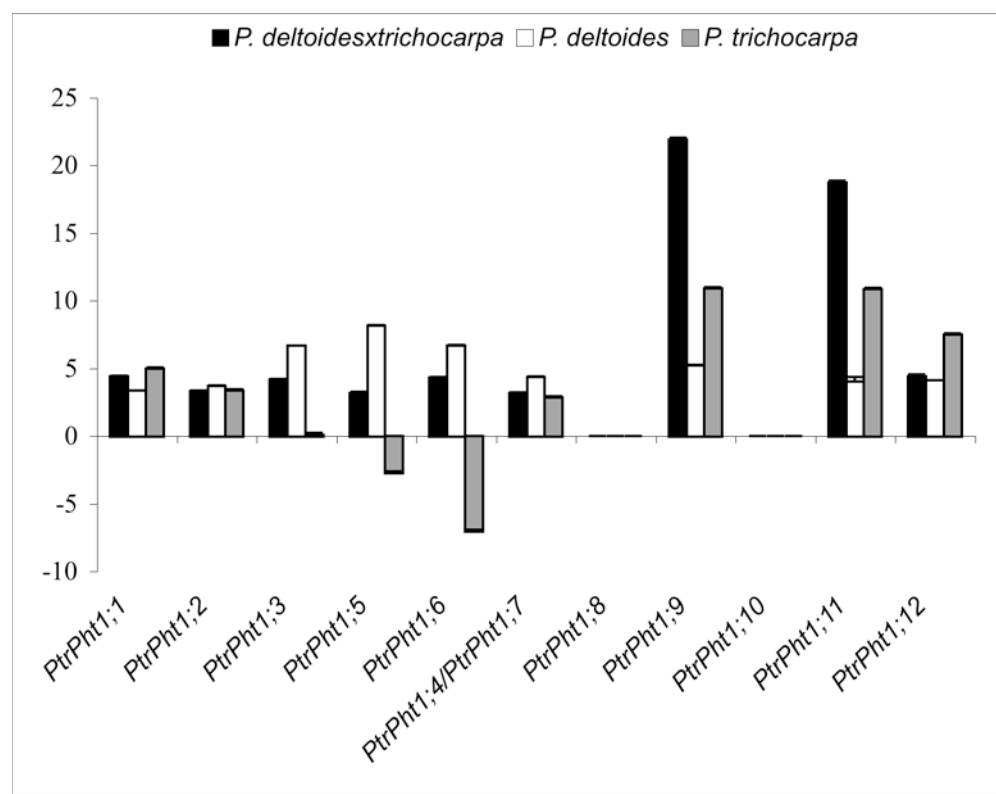


Figure 5

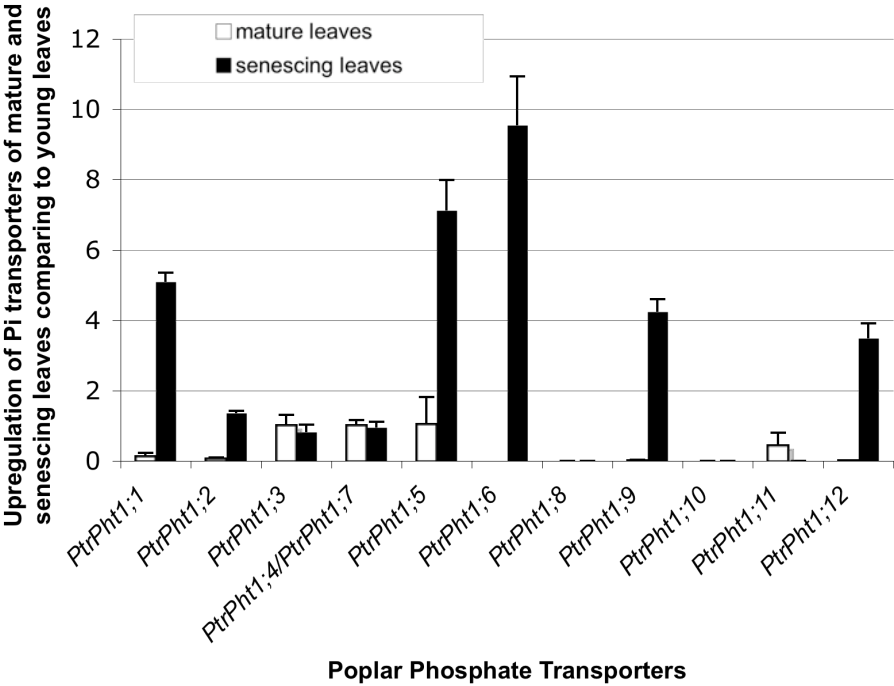


Figure 6.

