

# 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) *nifA* 基因通过诱导宿主防卫反应调节根瘤的形成

陈笑涛\* 邹华松\* 姚振华 CHENG HaiPing 戴小密 朱家璧 俞冠翘†

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; 中国科学院研究生院, 北京 100039; Biological Sciences Department, Lehman College, City University of New York, Bronx, New York 10468, USA.

\* 同等贡献. † 联系人, E-mail: gqyu@sipe.ac.cn

**摘要** 苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 基因是固氮基因的正调节因子, 本文研究了 *nifA* 基因对根瘤形成的调节作用. 在分裂根实验中, *nifA* 突变株对另一侧根结瘤抑制率比野生型菌下降 43.7%, 感染突变株植物合成的植保素和形成的坏死细胞的数量也相应减少, 与植物防卫反应相关的苯丙氨酸解氨酶基因、查儿酮合成酶基因和几丁质酶基因不能表达. 这些结果说明, 苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 基因通过诱导宿主植物的防卫反应对根瘤的形成进行调节. 虽然 *nifA* 突变株在宿主植物上引发根瘤的数量增加, 它合成的结瘤因子的量却比野生型菌株少. 因此, 可以推测 *nifA* 基因介导了多种信号途径对根瘤的形成进行调节.

**关键词** *nifA* 基因 防卫反应 根瘤形成 结瘤因子

根瘤菌在豆科植物的根部诱导根瘤的形成, 并为之建立共生关系 [1,2]. 根瘤的形成和发育需要共生双方很多基因的表达及相互之间的信号交流 [3]. 宿主植物分泌特殊的类黄酮诱导根瘤菌许多结瘤基因的表达, 如 *nod*, *nol* 和 *noe* 基因 [4]. 结瘤基因的功能是合成和分泌可诱导宿主植物结瘤的信号分子——结瘤因子, 决定根瘤菌的宿主专一性和侵染过程 [5]. 苜蓿中华根瘤菌结瘤因子的核心结构是一个非还原端酰化的  $\beta$ -1,4-*N*-乙酰葡萄糖胺残基, 并且在还原端和非还原端上都有决定宿主专一性的结构 [6,7].

环境中的氮或氨对共生互作中根瘤的形成有抑制作用. 共生系统的一个显著特征是可以维持合理的根瘤数量 [8], 这说明共生系统能感受环境中的多种信号以对结瘤进行精确的调节. 许多研究结果表明, 不仅外源施加的氮、氨和尿素可以抑制豆科植物结瘤, 根瘤菌固定的氮也对结瘤具有抑制作用 [9~11]. 在缺氮的条件下, 豆科植物接种不能固氮的根瘤菌突变株会表现超结瘤的表型 [12]. 现在已经发现, 豆科植物自我调节根瘤形成机制 (autoregulation of root nodule formation) 对感受氨信号和调节根瘤的形成起主要作用. 在分裂根实验中, 用野生型根瘤菌感染第一侧根会抑制宿主植物在另一侧根上形成根瘤 [13].

根瘤菌在侵染阶段诱导豆科植物产生微弱的防

卫反应. 寄主植物与病原物间的非亲和互作通常在侵染点的下方形成坏死细胞, 产生防卫反应. 与防卫反应和致病性相关的很多基因都被诱导表达 [14]. 同时, 一些代谢物在植物细胞中累积, 细胞壁结构发生变化以阻止病原物的进一步扩展 [15]. 共生互作过程中也有植物防卫反应的产生, 包括苜蓿植物与苜蓿中华根瘤菌之间的共生互作, 主要表现为根瘤菌侵染点附近的根毛迅速死亡及阻止根瘤的形成 [16]. 与防卫反应相关的酚类物质和蛋白在死亡细胞中含量的增加. 因此, 防卫反应是苜蓿植物调节侵染和结瘤的一种机制 [16].

以前的研究表明, 苜蓿中华根瘤菌的竞争结瘤基因 *nfe* 受 *nifA* 基因的调节 [17]. 引入多拷贝的 *nifHDK* 基因启动子的野生型苜蓿中华根瘤菌, 在宿主植物上的共生表型与 *nifA* 突变株类似, 形成大量不能固氮的根瘤 [18]. 这些结果说明, 苜蓿中华根瘤菌的 *nifA* 基因可能参与了结瘤的调节. 本研究对它调节结瘤的功能进行了探讨.

## 1 材料和方法

( ) 菌株. 所用的苜蓿中华根瘤菌为野生菌 Rm1021 [19], *nifA* 突变株 SmY [20] 和 *nifH* 突变株 Rm1491G [21]. 根瘤菌菌株在 LB/MC 培养基中 28 °C 培养 [22].

( ) RNA 提取和 RT-PCR. 接种根瘤菌 5, 10 和 15 d 后收获植物根, 用总 RNA 抽提试剂盒 (华舜, 中国) 提取根部的总 RNA, 去除污染的基因组 DNA 后, 用 Superscript RNaseH<sup>-</sup> 反转录酶 (Invitrogen, USA) 合成 cDNA. 设计特异性引物分别检测几丁质酶基因 (F, 5'-tgcttggggatactgtttgtgag-3'; R, 5'-gaagatc-gaaaggcctttgaga-3'), 苯丙氨酸解氨酶基因 (F, 5'-gtctt-ccaccttctgattgac-3'; R, 5'-cactcttctcctggtgaaatgaca-3') 和查儿酮合成酶基因 (F, 5'-atggagctgtgactgattgtt-3'; R, 5'-cagtttaagtgaagaccgggt-3') 的表达. 用苜蓿 *Msc27* 基因作为内标 (F, 5'-ggaatgttgggaggttga-3'; F, 5'-aaa-gaattgaaggtccttgagc-3'). PCR 反应程序按下列参数进行: 94 °C, 5 min; 94 °C, 50 s, 53 °C, 40 s, 72 °C, 50 s, 35 循环; 72 °C, 10 min.

( ) 分裂根实验. 分裂根实验参照以前的方法进行 [13]. 苜蓿种子用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 表面消毒 30 min 后用无菌水清洗 4 次, 再放到 1.5% 琼脂板上萌发. 待苜蓿的根长 1~2 cm 时用手术刀把根尖切除后继续培养. 待侧根长出后, 挑选能够长出同等大小两个侧根的苗, 其他的苗弃用. 在 Fahreus 固体培养基平板上分开两个侧根, 在一侧侧根上分别接种无菌培养基及根瘤菌 Rm1021, SmY 和 Rm1491G. 2 d 后在另一侧根上接种野生菌 Rm1021. 4 周后, 观察第二侧根上的根瘤数. 用不接菌植株第二侧根上的根瘤数作为分母, 计算根瘤减少的比值, 即抑制率.

( ) 坏死细胞的观察. 按 ( ) 的方法培养苜蓿, 只是不再切除根尖. 分别用根瘤菌野生菌 Rm1021, SmY 和 Rm1491G 接种苜蓿, 14 d 后将植物的根浸于 5% 亚甲蓝溶液中 5 min, 无菌水清洗 2 次, 在显微镜 (Leica DME) 下观察死亡的细胞.

( ) 植保素含量分析. 用苜蓿根瘤菌 Rm1021, SmY 和 Rm1491G 分别感染苜蓿植物 5, 10 和 15 d 后, 分别从每种处理植物上取 2 g 根, 迅速放入液氮冷冻 5 min, 在研钵中用 2 mL 甲醇将样品磨碎, 高速离心 (10000 r/min, 4 °C, 10 min), 上清浓缩后进行 HPLC 分

析 [23].

( ) 根瘤菌合成结瘤因子的含量分析. 用半定量根毛变形实验检测苜蓿根瘤菌产生的结瘤因子的含量 [24]. 在根瘤菌培养基中加入 2% 苜蓿种子浸出液, 待细菌长至 A<sub>600</sub> 值达到 0.8 的时候, 离心除去菌体, 上清过滤灭菌后处理苜蓿根部, 4 h 后用生理盐水漂洗根部, 在显微镜 (Leica DME) 下观察根毛变形情况.

## 2 结果

### 2.1 *nifA* 基因通过系统信号抑制根瘤的形成

分裂根实验证明, *nifA* 基因对结瘤具有调节功能. 在分裂根实验中, 在第二侧根上形成的根瘤数目反映出第一侧根所接菌株对结瘤的抑制效率. 第二侧根上的根瘤数越多, 说明接种于第一侧根上的根瘤菌对结瘤的抑制能力越低. 以第一侧根不接菌为对照, 第一侧根接种野生菌对第二侧根结瘤的抑制率达到 62.5%. 第一侧根接种 *nifH* 突变株 Rm1491G, 对第二侧根结瘤的抑制率为 56.3%, 与野生菌没有明显的差异. 而第一侧根接种 *nifA* 突变株 SmY 对第二侧根结瘤的抑制作用明显下降, 抑制率降低到 18.8% (表 1).

### 2.2 *nifA* 基因参与宿主防卫反应的诱导

植物与病原物非亲和互作中产生的防卫反应通常也在根瘤菌与宿主植物的互作中出现. 接种根瘤菌可以诱导宿主植物细胞死亡, 细胞的颜色变成黄色或黑色, 可以很清晰地与周围健康细胞区分开来. 在本研究中, 接种根瘤菌 4 d 后就可以观察到细胞开始死亡, 7 d 后可以在光学显微镜下清晰地识别坏死细胞. 观察到的细胞死亡频率与接种的菌株有密切的关系. 经过多次重复实验, 我们发现苜蓿根瘤菌野生菌和 *nifH* 突变株分别在每个根上诱导 35 和 25 个坏死细胞, 而接种 *nifA* 突变株 SmY 的根部仅有 10 个坏死细胞 (图 1(a)).

因为植保素的合成与细胞的坏死相关, 我们随后测定了宿主植物中植保素的含量. 在已知的多种植保素中, 我们随机选择了大豆黄素和染料木素进

表 1 苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变株对结瘤的抑制率<sup>a)</sup>

接种第一侧根的菌株	菌株特征	植物株数	第一侧根结瘤数	第二侧根结瘤数	结瘤抑制效率(%)	统计分析**
不接菌		8	0.0	6.4 ± 0.8	0	A
Rm1021	野生型	23	6.7 ± 0.7	2.4 ± 0.4	62.5	B
SmY	<i>nifA</i> ::Tn5	13	13.7 ± 1.6	5.2 ± 1.2	18.8	C
Rm1491G	<i>nifH</i> ::Tn5	15	6.0 ± 0.8	2.8 ± 0.9	56.3	B

a) 实验重复至少 3 次. \*\*, P<0.05

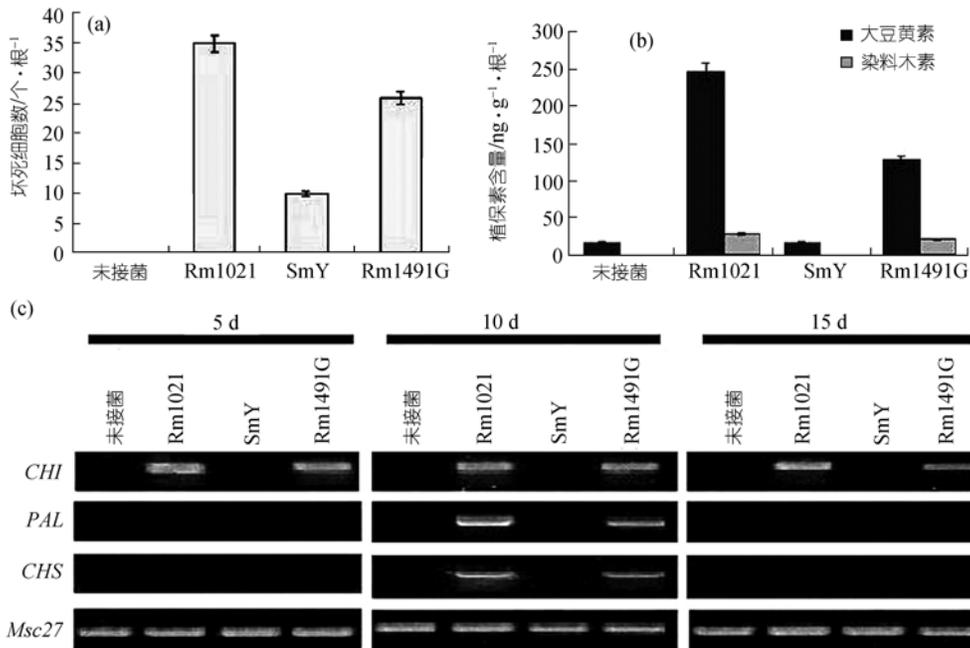


图 1 苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 基因参与宿主植物防卫反应的诱导

(a) 植物根部坏死细胞. 实验重复 3 次, 数据经统计学软件 Stata 分析,  $P < 0.05$ . (b) 大豆黄素和染料木素合成. (c) 苯丙氨酸解氨酶基因、查儿酮合成酶基因和几丁质酶基因的诱导表达. *CHI*, 几丁质酶基因; *PAL*, 苯丙氨酸解氨酶基因; *CHS*, 查儿酮合成酶基因

行 HPLC 分析. 接种野生菌 Rm1021 的苜蓿大豆黄素的含量最高, 每克根中有 250 ng, 是接种 SmY 菌株苜蓿的 22.8 倍; 接种野生菌的苜蓿中染料木素的含量是接种 SmY 菌株苜蓿的 18.7 倍, 而接种 *nifH* 突变株 Rm1491G 的苜蓿中, 大豆黄素和染料木素的含量比野生菌感染的苜蓿仅有少量的降低(图 1(b)).

苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查儿酮合成酶(CHS)和几丁质酶(CHI)是寄主植物与病原物非亲和互作中典型的防卫反应蛋白. 它们的编码基因都可以被病原菌诱导表达. 在接种苜蓿根瘤菌 5, 10 和 15 d 后, 用 RT-PCR 方法检测了这 3 个基因的转录表达. 它们都可以被苜蓿根瘤菌野生菌 Rm1021 和 *nifH* 突变株 Rm1491G 诱导表达. 几丁质酶基因在接种 5 d 后就可以检测到表达, 并可以持续到第 15 天. 苯丙氨酸解氨酶基因和查儿酮合成酶基因在接种后 10 d 被诱导表达, 在接种后 5 和 15 d 都没有检测到表达. 而 *nifA* 突变株在 5, 10 和 15 d 都不能诱导这 3 个基因的转录表达(图 1(c)).

### 2.3 *nifA* 突变株合成结瘤因子的半定量分析

为了探明苜蓿中华根瘤菌中 *nifA* 基因与结瘤因子合成之间的关系, 我们运用半定量根毛变形法测定了 *nifA* 突变株合成结瘤因子的水平. 苜蓿植株在

施加结瘤因子之前, 在显微镜下预先观察一次, 根毛已经发生变形的植株弃用. 用结瘤因子处理后, 植株在 28 °C 培养 4 h, 在显微镜下观察发生变形的根毛. 在 3 次重复实验中, 野生菌 Rm1021 可以引起 80%~90%根毛发生变形, *nifH* 突变株引起 40%~70%的根毛发生变形, 而 *nifA* 突变株引起 30%~50%的根毛发生变形. 野生菌引起根毛变形的数量比两个突变株都多, *nifA* 突变株引起的根毛变形最少, 这说明 *nifA* 基因突变以后, 结瘤因子的合成量下降.

### 3 讨论

苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 基因是固氮正调节基因, 调节很多固氮酶编码基因和微氧呼吸基因, 其中 *nifH* 是一个固氮酶编码基因<sup>[17]</sup>. *nifH* 突变株的共生表型与 *nifA* 突变株相似, 在苜蓿植物上引发大量不能固氮的白色根瘤, 苜蓿植物叶片发黄, 处在氮饥饿状态<sup>[20]</sup>. 因为氮是调节结瘤的一个信号, *nifA* 突变后导致的缺氮生长条件是根瘤数目增加的原因之一. 为了说明 *nifA* 基因对结瘤的调节作用, 我们在分裂根实验中用 *nifH* 突变株 Rm1491G 作平行对照, 用来评价缺氮条件对第二侧根根瘤形成的影响. 与野生菌相比, Rm1491G 对另一侧根结瘤的抑制率稍有降低, 而 *nifA* 突变株的抑制率下降了 60%, 说明 *nifA* 突变后引起的

结瘤抑制率降低,主要来自*nifA*基因本身的突变,由于缺氮引起的抑制率降低很少.因此,苜蓿中华根瘤菌*nifA*基因是一个多效性调节基因,参与了共生系统自我调节结瘤.

苜蓿中华根瘤菌*nifA*基因通过介导宿主植物的防卫反应来抑制根瘤的形成.*nifA*基因对根瘤形成的调节作用在我们的分裂根实验中得到充分的证明,*nifA*基因通过系统的信号传导,抑制了另一侧根上根瘤的形成.本研究结果还发现,接种*nifA*突变株的苜蓿植物根部合成的植保素和形成的坏死细胞都比接种野生菌的根少,与植物防卫反应相关的苯丙氨酸解氨酶基因、查儿酮合成酶基因和几丁质酶基因都不能被*nifA*突变株诱导表达.因此,苜蓿中华根瘤菌*nifA*基因是通过介导宿主植物的防卫反应调节结瘤的.与此同时,结瘤因子对诱导宿主防卫反应的贡献下降,因为*nifA*突变株合成的结瘤因子比野生菌少.这与我们最近的研究结果<sup>[25]</sup>一致:*nifA*突变的根瘤中,6个结瘤基因*nodF*, *nodH*, *nodQ2*, *nodB*, *nodD3*和*nodE*的表达水平都下降.

最近几年的研究说明,接种根瘤菌或直接用结瘤因子处理,都可以诱导宿主植物产生防卫反应<sup>[16,26]</sup>.对结瘤因子的结构分析发现结瘤因子具有诱导防卫反应的激发子的特征<sup>[27]</sup>.还有报道认为,外源施用植物激素乙烯和茉莉酸也能够抑制根瘤的形成<sup>[28]</sup>.因为这两个植物激素在植物与病原体非亲和互作中参与了防卫反应的诱导,我们推测诱导防卫反应也是它们抑制结瘤的一个机制<sup>[29]</sup>.但苜蓿接种胞外多糖缺陷的不固氮根瘤菌突变株,反而使宿主植物的防卫反应减弱<sup>[23,30,31]</sup>,这可能是因为胞外多糖本身就是一个诱导植物防卫反应的信号分子<sup>[32]</sup>.根瘤菌侵染过程中参与诱导宿主防卫反应的因素很多,而这些因素如何协同作用现在还不清楚,有待进一步研究.

类黄酮是植物合成的一类植保素,在大豆和苜蓿等豆科植物中都有存在.而在大豆植物中类黄酮的含量最高,特别是大豆黄素和染料木素.鉴于类黄酮对人体健康的多种益处,通过基因工程方法在粮油作物和饲草中增加类黄酮的含量越来越受到关注<sup>[33]</sup>.但在豆科植物中,类黄酮物质对根瘤的形成有双重效应,在根瘤形成之前,豆科植物分泌的类黄酮可以诱导根瘤菌的结瘤基因的表达,在根瘤形成过程中,类黄酮物质又可以作为植保素,抑制根瘤的继续

形成.因此,利用基因工程改造豆科植物类黄酮合成时,需要对植物的结瘤进行细致的观察和评价.

致谢 感谢 Jording D 博士提供苜蓿中华根瘤菌*nifH*突变菌株 Rm1491G.

## 参 考 文 献

- 1 Cohn J, Day R B, Stacey G. Legume nodule organogenesis. Trends Plant Sci, 1998, 3: 105—110[DOI]
- 2 Hirsch A M. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol, 1992, 122: 211—237[DOI]
- 3 Halverson L J, Stacey G. Signal exchange in plant-microbe interaction. Microbiol Rev, 1986, 50: 193—225
- 4 Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiol, 2000, 124: 531—540[DOI]
- 5 Perret X, Staehelin C, Broughton W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64: 180—201[DOI]
- 6 Fisher R F, Long S R. *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature, 1992, 357: 655—660[DOI]
- 7 Dénarié J, Debelle F, Promé J C. *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu Rev Biochem, 1996, 65: 503—535[DOI]
- 8 Oka-Kira E, Kawaguchi M. Long-distance signaling to control root nodule number. Curr Opin Plant Biol, 2006, 9: 496—502[DOI]
- 9 Dart P J. Infection and development of leguminous nodules. In: Hardy R W F, Silver W S, eds. A Treatise on Dinitrogen Fixation. New York: Wiley, 1977. 367—472
- 10 Dart P J, Mercer F V. The legume rhizosphere. Arch Microbiol, 1964, 47: 344—378
- 11 Malik N S A, Calvert H E, Bauer W D. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. Plant Physiol, 1987, 84: 266—271
- 12 Hirsch A M, Smith C A. Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. J Bacteriol, 1987, 169: 1137—1146
- 13 Olsson J E, Nakao P, Greshoff P M. Lack of systemic suppression of nodulation in split-root systems of supernodulating soybean (*Glycine max*[L] Merr.) mutants. Plant Physiol, 1989, 90: 1347—1352
- 14 Heath M C. Hypersensitive response-related death. Plant Mol Biol, 2000, 44: 321—334[DOI]
- 15 Beers E P, McDowell J M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 561—567[DOI]
- 16 Vasse J, de Billy F, Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*: Alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. Plant J, 1993, 4: 555—566[DOI]
- 17 Fischer H M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. Microbiol Rev, 1994, 58:352—386
- 18 吴桐, 朱家璧, 俞冠翹, 等. 苜蓿根瘤菌多拷贝固氮基因启动子对根瘤发育的抑制. 中国科学 C 辑: 生命科学, 1994, 24: 1053—1059
- 19 Meade H M, Long S R, Ruvkun G B, et al. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizo-*

- bium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol, 1982, 149: 114—122
- 20 杨成涛, 俞冠翹, 沈善炯, 等. 苜蓿中华根瘤菌 Sm NifA 蛋白与阴沟肠杆菌 EcNifA 蛋白功能差异的研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2003, 33: 398—404
- 21 Jording D, Sharma P K, Schmidt R, et al. Regulatory aspects of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in *Rhizobium meliloti*: Transcriptional activation and dependence on effective symbiosis. J Plant Physiol, 1992, 141: 18—27
- 22 Pellock B J, Cheng H P, Walker G C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. J Bacteriol, 2000, 182: 4310—4318[DOI]
- 23 Niehaus K, Kapp D, Pühler A. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. Planta, 1993, 190: 415—425
- 24 赵洁平, 戴小密, 许玲, 等. 固氮正调节基因 *nifA* 促进大豆根瘤菌的结瘤效率. 科学通报, 2001, 46: 1984—1987
- 25 田哲贤, 邹华松, 李健, 等. *nifA* 突变的苜蓿根瘤菌在根瘤中的转录组学分析. 科学通报, 2006, 51: 1787—1793
- 26 Savouré, Sallau, C, El-Turk J, et al. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related response. Plant J, 1997, 11: 277—287[DOI]
- 27 Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: A family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. Curr Opin Microbiol, 2002, 5: 76—80[DOI]
- 28 Sun J, Cardoza V, Michell D M, et al. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. Plant J, 2006, 46: 961—970[DOI]
- 29 Kunkel B N, Brooks D M. Cross talk between signaling pathways in pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol, 2002, 5: 325—331[DOI]
- 30 Leigh J A, Signer E R, Walker G C. Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 6221—6235[DOI]
- 31 Dunlap J, Minami E, Bhagwat A A, et al. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic  $\beta$ -glucan synthesis. Mol Plant Microbe Interact 1996, 7: 546—555
- 32 Dow M, Newman M A, von Roepenack E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annu Rev Phytopathol, 2000, 38: 241—261[DOI]
- 33 Deavours B E, Dixon R A. Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. Plant Physiol, 2005, 138: 2245—2259[DOI]