

# 百脉根 LysM 型受体 LcLRK1 参与 菌根真菌丛枝形成

韩亚超<sup>1,2</sup> 谢贤安<sup>2</sup> 耿聪<sup>2</sup> 赵斌<sup>2</sup>

1. 阜阳职业技术学院生化工程学院, 阜阳 236031;

2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 从日本百脉根(*Lotus corniculatus*)中克隆到一个可能与菌根因子识别相关的 *LcLRK1* 基因,通过设计简并引物并利用 RACE PCR 手段,在百脉根中扩增得到 *LcLRK1* 基因全长序列。通过生物信息学的方法,对 *LcLRK1* 基因进行结构分析和预测;接种 *Rhizophagus irregularis*,检测 *LcLRK1* 基因在百脉根不同组织中的表达水平;构建 *ProLcLRK1::GUS* 重组载体,观察 *LcLRK1* 基因在根中的表达部位;最后通过 RNA 干扰 (RNAi) 技术进行 *LcLRK1* 基因沉默。结果表明:*LcLRK1* 编码一个 LysM 型受体激酶,由 3 个胞外 LysM 结构、1 个跨膜结构域与 1 个胞内激酶结构域组成;*LcLRK1* 在 AM 共生早期表达水平明显增强,并在根的表皮细胞及根毛基部表达;*LcLRK1* 基因沉默后抑制了早期丛枝的形成;相对于对照组,在 *LcLRK1*RNAi 的植株中 AM 真菌的侵染率明显下降,丛枝数目也明显降低。证实 *LcLRK1* 基因与菌根真菌信号分子识别相关,并且影响 AM 真菌丛枝的形成。

**关键词** 日本百脉根; 菌根因子; *LcLRK1* 基因; 根内球囊霉; LysM 型受体激酶; RNA 干扰

**中图分类号** QS 154.38<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0038-11

丛枝菌根 (arbuscule mycorrhiza, AM) 是球囊菌门 (Glomeromycota) 的 AM 真菌与陆生植物根形成的互惠共生体。AM 在植物根细胞内形成复杂的根内菌丝体和高度分化的树状丛枝结构<sup>[1-2]</sup>, 并且根内菌丝迅速延伸到根外形成庞大的根外菌丝网, 以此来吸收土壤中的矿质营养和水分<sup>[3-4]</sup>。在自然界的高等陆生植物中有 80% 以上可与土壤中的菌根真菌形成 AM 共生体<sup>[5]</sup>。在 AM 共生体中, 丛枝菌根 (AM) 为宿主植物提供无机矿质营养 (主要是磷素和氮素), 促进植物生长发育; 反过来, AM 真菌从植物的光合作用产物中获得碳水化合物<sup>[6-7]</sup>。这种共生体在生态系统的磷循环、氮循环、碳循环中发挥着重要作用, 同时促进陆地生态系统的初级生产力, 因此, AM 共生体对于自然界的物质循环有着极其重要的生态学意义。

AM 共生体的形成与发育需要经历一系列不同的阶段。一般来说, 主要包括共生前期、附着胞时期、共生早期、AM 共生时期 (丛枝形成时期) 以及共

生后期 (根外菌丝与孢子形成时期)。共生前期主要特征是 AM 真菌孢子萌发以及宿主植物根系分泌激素独脚金内酯 (SLs), SLs 促进真菌菌丝分枝<sup>[8]</sup>; 另一方面, AM 真菌分泌扩散性信号分子或菌根因子 (Myc factor) LCOs 诱导宿主植物中共生相关基因的表达<sup>[9-11]</sup>。随后分枝的菌丝在根的表面形成附着胞结构, 此阶段称为附着胞时期<sup>[12]</sup>。附着足从附着胞上形成, 迅速侵入外皮层细胞, 进行胞间和胞内生长且在胞内形成具有引导作用的前侵染体结构 (PPA), 此结构引导胞内菌丝进入中皮层细胞<sup>[13]</sup>, 此阶段为共生早期; 真菌菌丝一旦进入内皮层细胞后, AM 真菌便在皮层细胞内高度分化并形成二歧分枝的菌丝结构, 被称为丛枝 (arbuscules)<sup>[14]</sup>。这些复杂而高度分化的丛枝结构被一部分植物细胞膜 (PAM) 包裹着, 从而形成了丛枝-植物细胞共生界面<sup>[15]</sup>, 此阶段为丛枝形成时期。与此同时, AM 真菌菌丝延伸到根系外的土壤中形成根外菌丝体, 这些菌丝体能吸收土壤中的磷素及其他矿质营养元

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270159); 教育部高等学校青年骨干教师国内访问学者项目 (201312045); 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2015A433); 安徽省教育厅质量工程项目 (2013jxtd055, 2015jxtd062)

韩亚超, 副教授。研究方向: 应用与环境微生物。E-mail: fyhanych@163.com

通信作者: 赵斌, 教授。研究方向: 菌根真菌分子生物学。E-mail: binzhao@mail.hzau.edu.cn

素,同时形成新一代的侵染宿主根的孢子,此阶段为根外菌丝体时期。

在丛枝菌根形成过程中,控制和影响 AM 结构形成的因素是多方面和多水平的。在共生前期与早期,AM 真菌分泌的信号分子(如 LCOs)影响真菌对宿主根的侵染以及丛枝结构的形成<sup>[11]</sup>,宿主植物中菌根型的 LysM 结构域受体激酶基因控制丛枝结构的形成<sup>[16]</sup>。在共生时期,植物中与共生信号途径密切相关的基因 *DMI1*、*DMI2* 与 *DMI3* 是 AM 结构形成的必需基因<sup>[17]</sup>。在丛枝形成时期,许多植物基因的突变直接影响丛枝的形成与发育;*VAPYRIN* 基因调节早期胞内菌丝的分化,该基因突变导致形成鸟足状(或分枝程度低)丛枝结构<sup>[18]</sup>。*STR1/2*<sup>[19]</sup> 与 *RAM1/2*<sup>[20]</sup> 基因的作用是促进丛枝的成熟。苜蓿的 *PT4* 与水稻的 *PT13* 基因的主要功能是维持丛枝的生命周期,延迟丛枝的衰老与死亡<sup>[21-22]</sup>。

近期研究表明,AM 真菌的菌根因子脂质几丁糖(Myc-LCOs)与根瘤菌的结瘤因子(Nod factor)具有相似的结构<sup>[23]</sup>。在豆科植物中,宿主对根瘤菌结瘤因子的识别需要 2 类编码 LysM 结构域受体激酶的基因,在日本百脉根(*Lotus japonicus*)中是 *LjNFR1a* 与 *LjNFR5* 基因;在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中是 *MtLYK3* 与 *MtNFP* 基因<sup>[24-26]</sup>。这些蛋白质具有相似的结构;含有 3 个 LysM 的胞外结构域、1 个跨膜结构域和 1 个胞内激酶结构域,其中任何一个基因的突变均能阻止结瘤因子的诱导效应<sup>[27-29]</sup>。有趣的是,非豆科植物榆科糙叶山黄麻属(*Parasponia*)可以与根瘤菌共生形成类根瘤结构,PaNFP 可以作为识别结瘤因子和菌根因子的共同受体。这表明在榆树中,丛枝菌根共生体和根瘤共生体的形成受同一个受体蛋白的调控<sup>[16]</sup>。由于豆科植物在进化过程中整个基因组发生复制,导致这种类似的同源基因在大豆、苜蓿和百脉根中也相继被发现<sup>[30-31]</sup>。因此,在苜蓿和百脉根中也可能存在着同类受体,可以作为菌根信号分子的受体<sup>[32-33]</sup>。到目前为止,关于菌根真菌特异性受体的研究还比较少,但对于根瘤菌受体的研究比较深入,因此,可以通过现有的结瘤因子受体研究为菌根信号受体的发现提供新思路。

笔者从豆科植物百脉根(*Lotus corniculatus*)中克隆到一个与菌根真菌信号识别相关的 LysM 型受体激酶 *LcLRK1* 基因,通过分子生物学与反向遗传学方法探讨 *LcLRK1* 基因与丛枝结构形成的关系,

旨在为菌根真菌共生体分子机制的建立和菌根信号途径研究及 AM 真菌在农业生态系统中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 及植物表达载体 pBI121,均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室菌根分室提供。

### 1.2 植物材料与 AM 真菌接种剂

日本百脉根(*Lotus corniculatus*)种子由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室菌根分室提供,AM 真菌根内球囊霉菌(*Rhizophagus irregularis* AH101)购于中国科学院北京生态环境研究中心。

### 1.3 培养基

LB 培养基、水琼脂培养基:按 0.5%~2% 的量添加琼脂粉;1/2 MS 培养基:1/2(大量元素+微量元素+铁盐+有机物+0.2%植物凝胶),pH 5.8;发根培养基为 HRE 培养基<sup>[34]</sup>。

### 1.4 引物序列

引物合成由上海生工生物工程有限公司完成(引物序列见表 1),基因序列测序是由擎科生物完成。

### 1.5 日本百脉根的生长条件

将百脉根种子放入三角瓶中,加浓硫酸处理 8 min,再用无菌水冲洗 1 次,加入稀释 10 倍的 NaClO 溶液处理 12 min,无菌水冲洗 3 次,将灭菌的百脉根种子放在 37 °C 培养箱,待种子吸水膨胀后在水琼脂培养基上铺种。将洗净的沙子每天进行 1 次 121 °C、1 h 的高温高压灭菌,连续 3 次;用 75%乙醇将盆表面消毒。每个盆钵植入等量生长一致的幼苗,用保鲜膜覆盖盆口后置入 22 °C 培养箱中炼苗(光照 16 h/黑暗 8 h),2~3 d 后去除保鲜膜。

### 1.6 总 DNA 与 RNA 的抽提及基因表达的检测

百脉根总 DNA 的分离参照植物总 DNA 提取试剂盒方法(天根试剂 Plant DNA mini Kit,北京);采用 CTAB 法提取百脉根的总 RNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 与 RNA 的完整性,利用核酸定量仪(Thermo NANO Drop 2000)检测 DNA 与 RNA 的浓度和纯度。按照反转录试剂盒(TaKa Ra公司)操作手册进行实验,反转录合成第 1 链

表 1 本研究所用的引物序列  
Table 1 The primer sequences in this study

| 名称<br>Primer name | 序列<br>Sequence (5'→3')             | 用途<br>Function     |
|-------------------|------------------------------------|--------------------|
| <i>LcLRK1-F</i>   | ATGSAAATCTKGTGAAACTAATGG           | Gene cloning       |
| <i>LcLRK1-R</i>   | CATCCAYTTTCTTAIICTCTCYTCTCT        | Gene cloning       |
| <i>LcLRK1IF2</i>  | GTTGAAGTTCTCGCCATTGAG              | Inverse PCR        |
| <i>LcLRK1IR2</i>  | GAGACCAAGTAAGGGACACC               | Inverse PCR        |
| <i>LcLRK1F2</i>   | GAAGGTGTTGACATTGAGGGAG             | RACE PCR           |
| <i>LcLRK1R2</i>   | GAGGACTCGAGCTCAAGC                 | RACE PCR           |
| <i>LcLRK1PF</i>   | CCCAAGCTTGTGTTAGCACACAGTATGAC      | Promoter isolation |
| <i>LcLRK1PR</i>   | CGCGGATCCTTTTGGGTAAGTTGTGAAGAAATG  | Promoter isolation |
| <i>LcLRK1QF</i>   | AGAAGAGAGGGCTAAGAAAATGGATG         | Real time PCR      |
| <i>LcLRK1QR</i>   | ACAATTCAGCAACGCTTGG                | Real time PCR      |
| <i>LcLRK1dsF</i>  | TAAGTAGTGGTACCGTTCTTAGTCTCTCCCTTC  | RNAi               |
| <i>LcLRK1dsR</i>  | TAGAGCTCGGATCCGAGACACAGAAATAAGCAAC | RNAi               |
| <i>LcATPF</i>     | CAATGTCGCCAAGGCCATGGTG             | Reference gene     |
| <i>LcATPR</i>     | AACACCACTCTCGATCATTCTCTG           | Reference gene     |
| <i>LjNFR5QF</i>   | AACTTCGACCAACCCCATG                | Real time PCR      |
| <i>LjNFR5QR</i>   | GATCTCCACATATCCTTCCAC              | Real time PCR      |
| <i>LjNFR1QF</i>   | GCCCTTTCAACACAAGATGC               | Real time PCR      |
| <i>LjNFR1QR</i>   | GCCTTCGCTAGTTCCTGATATG             | Real time PCR      |
| <i>LjLYS1QF</i>   | ATGGTAGCTATGTGCCCTTTC              | Real time PCR      |
| <i>LjLYS1QR</i>   | GCCCAACTAGTACTCCAACAG              | Real time PCR      |
| <i>LjLYS5QF</i>   | CACGATTACCATTCCCAAAGC              | Real time PCR      |
| <i>LjLYS5QR</i>   | AGATCCATATGTTCCATGCCC              | Real time PCR      |
| <i>LjLYS20QF</i>  | TCCCACTCAAACCTCATAGC               | Real time PCR      |
| <i>LjLYS20QR</i>  | ACCATTTCAACATCCCTCAC               | Real time PCR      |

cDNA,放入-20℃冰箱中备用。cDNA稀释5倍作为模板,体系如下:1μL cDNA模板,基因上游引物(0.5μmol),基因下游引物(0.5μmol),10μL SYBR Green Real time PCR Master Mix(TOYOBO),用*LcATP*基因作为内参。反应程序:95℃变性30s;95℃变性30s,58℃退火20s,72℃延伸20s,40个循环;PCR反应在Applied Biosystems 荧光定量PCR仪(step one™ Real-Time PCR system Thermal cycling ABI7300)中进行,反应后进行熔解曲线分析,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法。

### 1.7 *LcLRK1* 基因的克隆与测序

根据*MtNFP/LjNFP5*与*MtLYR1/LjLYS11*基因序列设计简并引物,以引物*LcLRK1-F*和*LcLRK1-R*从日本百脉根DNA中扩增*MtNFP/LjNFP5*同源基因。按下列体系进行PCR反应:1×Buffer,dNTPs(0.25mmol),*Taq*DNA聚合酶(0.05U),*LcLRK1-F*(0.4μmol),*LcLRK1-R*(0.4μmol),模板DNA(分别用基因组DNA稀释100倍或cDNA作为模板)1μL,ddH<sub>2</sub>O补足20μL。反应程序:94℃预变性1min;94℃变性30s,50℃退火30s,72℃延伸45s,30个循环;72℃延伸10min,降温至20℃。通过分子克隆及测序获得1个单基因片段,再利用RACE PCR方法<sup>[35-36]</sup>从根组织的cDNA中获得基

因全长序列(命名为*LcLRK1*)。

### 1.8 *LcLRK1* 基因结构分析

将获得的*LcLRK1*全长氨基酸序列提交到SMART在线工具建立蛋白质模体结构。将*LcLRK1*的氨基酸序列提交到SWISS-Mode(<http://swissmodel.expasy.org/>),用自动模式建立*LcLRK1*蛋白质的三维结构模型,通过Swiss-Pdb Viewer4.0.1软件对*LcLRK1*蛋白质三维结构进行预测和分析。通过DNA MAN对*LcLRK1*同源蛋白质进行多序列比对分析,通过MEGA4.0软件的Neighbor-Joining方法,选用Bootstrap值为1000构建无根系统发育树(蛋白质序列名称及其序列号如表格2所示)。

### 1.9 RNAi载体和Pro*LcLRK1*::GUS报告基因表达载体的构建

在*LcLRK1*基因的3'末端非编码区设计引物*LcLRK1dsF*和*LcLRK1dsR*扩增310bp目的干扰片段。先将目的片段通过Gateway方法的PB反应克隆到入门载体pDONR211生成pDONR211-*LcLRK1*-RNAi重组载体,然后通过LR反应将pDONR211-*LcLRK1*-RNAi重组到目的载体pK7GWIWG2(II)-RedRoot中,构建成具有反向重复结构并携带红色荧光*DsRED1*报告基因的植物

表2 本研究所用的同源基因及其序列号  
Table 2 The homologous genes and their accession numbers employed in this study

| 物种<br>Species                      | 基因名称<br>Gene name | 序列号<br>Accession numbers |
|------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjNFR1a</i>    | J575248                  |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjNFR1b</i>    | J575249                  |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjNFR5</i>     | CAE02598                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS1</i>     | AB503682                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS2</i>     | AB503683                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS3</i>     | AB503684                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS4</i>     | AB503685                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS5</i>     | AB503686                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS6</i>     | AB503687                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS7</i>     | AB503688                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS11</i>    | AB503692                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS12</i>    | AB503693                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS13</i>    | AB503694                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS14</i>    | AB503695                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS16</i>    | AB503696                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS20</i>    | AB506703                 |
| 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>         | <i>LjLYS21</i>    | AB506704                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK1</i>     | AY372401                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK2</i>     | AY372420                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK3</i>     | AY372406                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK4</i>     | AY372402                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK5</i>     | AY372403                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK6</i>     | AY372404                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK7</i>     | AY372405                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtLYK8</i>     | AY372406                 |
| 蒺藜苜蓿<br><i>Medicago truncatula</i> | <i>MtNFP</i>      | ABF50224                 |
| 大豆 <i>Glycine max</i>              | <i>GmNFR5a</i>    | ADJ19108                 |
| 大豆 <i>Glycine max</i>              | <i>GmNFR5b</i>    | ABQ59613                 |
| 榆树 <i>Parasponia</i>               | <i>PaNFP</i>      | HQ705608.1               |
| 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>         | <i>RcLYR1</i>     | XP002533280              |
| 杨树 <i>Populus tremula</i>          | <i>PtLYR2</i>     | XP002310198              |
| 水稻 <i>Oryza sativa</i>             | <i>OsNFP</i>      | ACI03891.2               |

RNAi 表达载体。将验证为阳性的干扰载体或空载对照载体电转化到发根农杆菌 (*A. rhizogenes* LBA1334)。为了分析 *LcLRK1* 基因的组织定位, 通过反向 PCR 方法克隆得到 ORF 上游区域 1.2 kb 大小的启动子片段, 在特异引物末端添加 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切位点, 通过双酶切反应分别消化启动子片段与 pBI121 质粒, 利用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶将启动子片段克隆到 pBI121 载体的 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切位点之间, 构建带有 GUS 标记基因的启动子定位载体 *ProLcLRK1* :: *GUS*。

## 1.10 农杆菌介导的毛根转化

待幼苗根部伸长至 1 cm 时, 从下胚轴处将幼苗快速切开, 收集子叶部分作为百脉根外植体。将外植体下胚轴浸入农杆菌悬液中, 15~30 min 后取出置于灭菌滤纸上吸干残液, 植入不含蔗糖的 1/2 MS 培养基上, 暗培养 3~5 d 后可见切口处有大小不等的膨大。此时将幼苗移入添加羧苄青霉素的 HRE 培养基中, 10 d 左右毛根从下胚轴处长出约 2~3 cm。取具有大量转化根且整体长势良好的百脉根幼苗平铺于水琼脂平板上, 用干净的镊子将每株幼苗的根分开并依次编号, 进行 GUS 活性或荧光信号检测, 然后选择阳性转化植株进行盆栽实验。

## 1.11 阳性毛根鉴定

1) GUS 活性检测。利用农杆菌介导的百脉根遗传转化技术, 得到转化毛根, 通过 GUS 染液染色, 37 °C 的条件下放置一段时间, 观察 p*LcLRK1* :: *GUS* 在不接种菌根真菌以及接种菌根真菌后不同时间的表达情况。

2) 荧光信号检测。共培养 5 d 后, 幼苗切口处观察到大小不等的膨大, 可将外植体转入含 100 mg/L 羧苄青霉素的 HRE 培养基中。待毛根从下胚轴长出, 在荧光显微镜下观察, 若毛根出现较强的红色荧光, 则判定为阳性根, 将无荧光的非阳性毛根切掉。

## 1.12 AM 菌根侵染率的统计

将收集的 AM 根系用蒸馏水冲洗干净, 浸入 10% KOH 溶液, 90 °C 水浴消化 30 min 后, 用蒸馏水轻轻冲洗, 再用 2% HCl 溶液浸洗 20 min 至自然冷却, 用蒸馏水冲洗残留的 HCl 溶液, 最后加入 0.05% 的台盼蓝 (TB) 染液常温过夜。用 10% 的甘油将根中的浮色洗去, 将根剪成约 1 cm 长的根段, 并随机挑取根段摆放在载玻片上 (每个载玻片放置 30 条根段), 在显微镜下观察 AM 真菌侵染情况, 丛枝菌根真菌侵染率的统计采用 Trouvelot 等<sup>[37]</sup>所描述的方法进行。

## 1.13 统计分析

每组实验设置至少 3 个生物重复, 技术重复至少 3 次, 数据用 SPSS16.0 软件进行 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 LcLRK1 基因编码一个 LysM 型受体激酶

设计简并引物, 从日本百脉根中扩增 *MtNFP*/*LjNFP5* 同源基因, 再利用 RACE PCR 方法从根



组织的 cDNA 中获得基因全长序列(命名为 *LcLRK1*)并对基因序列进行拼接,*LcLRK1* 基因全长为 1 797 bp,*LcLRK1* 基因不含内含子。全长开放阅读框(ORF)编码 598 个氨基酸,预测其分子质量为 66 ku,理论等电点为 5.50。

将 *LcLRK1* 基因编码的氨基酸序列提交到 SMART 工具进行结构预测分析,发现 *LcLRK1* 含有 3 个胞外 LysM 结构域,还包括 1 个跨膜结构域和 1 个胞内蛋白激酶结构域,是一个典型的 LysM 型受体激酶(图 1A)。利用 SWISS-Model 软件对 *LcLRK1* 蛋白质序列的三维结构进行分析(图 1B),发现 *LcLRK1* 是一个富含亮氨酸的蛋白质,属于 LysM-RLK 家族中的一个成员,并且 LysM-RLK 家族蛋白质的功能与 AM 真菌共生和/或根瘤菌信号的识别相关<sup>[31-32]</sup>,因此,推测 *LcLRK1* 编码的蛋白可能与菌根因子(Myc 因子)或/和 结瘤因子(Nod 因子)识别相关的一个受体。

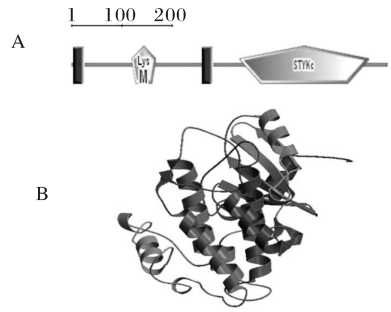


图 1 预测的目的蛋白 *LcLRK1* 保守结构域 (A) 与 3D 结构图 (B)

Fig.1 The putative conserved domains (A) and three-dimensional tstructure model (B) of the *LcLRK1* protein

### 2.2 *LcLRK1* 蛋白质的进化分析

通过多序列比对发现 *LcLRK1* 与 *MtNFP*、*LjNFR5*、*GmNFR5*、*LjLYS11*、*PaNFP* 基因编码的蛋白质序列具有较大的相似性(图 2)。*LcLRK1* 蛋白质结构包括 1 个 N 端信号肽, LysMI、LysMII

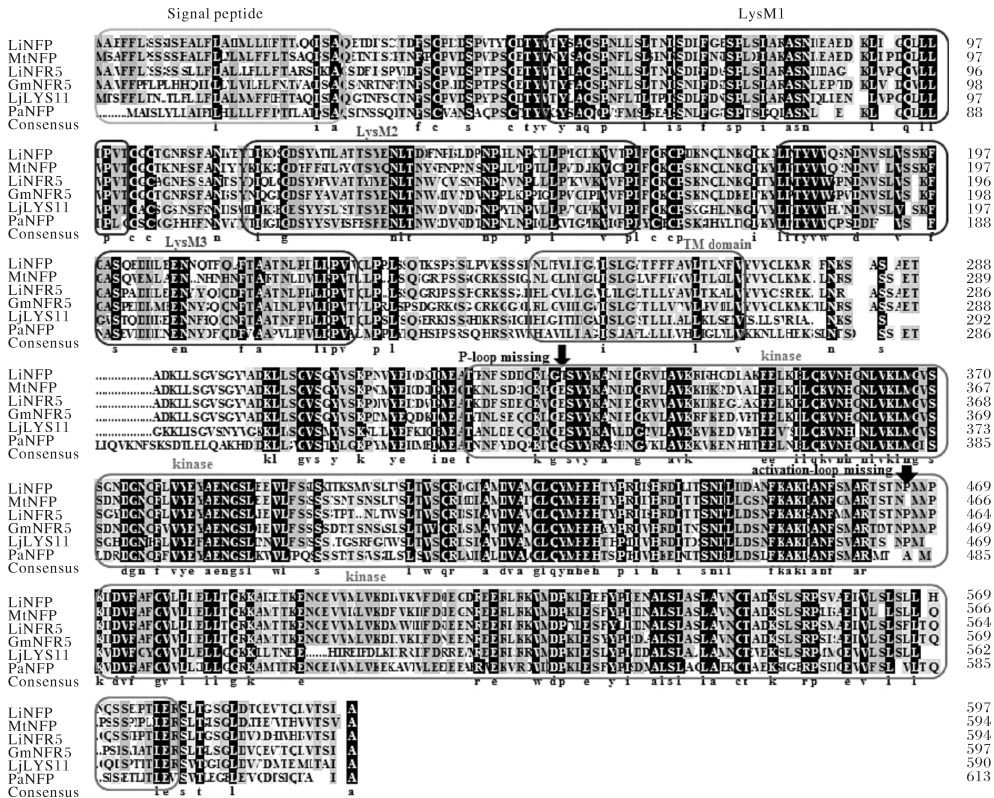


图 2 百脉根 LysM 型受体激酶 *LcLRK1* 蛋白及不同植物来源的同源蛋白质序列的比对

Fig.2 Amino acid multiple alignment of the LysM-type receptor kinases *LcLRK1* (*L. corniculatus*) and its homologs from other plants

和 LysMIII, 1 个跨膜结构域和蛋白激酶结构域,图 2 中的 6 个蛋白质都出现 P 环和激酶活化环的缺失。近期研究表明,PaNFP 作为结瘤因子信号受体

和菌根分子信号受体<sup>[16]</sup>, *LcLRK1* 基因编码的 LysM 型蛋白质可能与 PaNFP 具有类似的生物学功能,由此推测 *LcLRK1* 可能是一个与 *LjNFR5* 和

*PaNFP* 类似的受体。

为了确定 *LcLRK1* 基因的进化地位, 将 *LcLRK1* 的氨基酸序列和几个模式菌根植物的同源基因通过软件比对构建系统进化树(图 3), 结果显示, *LcLRK1* 蛋白与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中的 *NFP*、日本百脉根(*Lotus japonicus*)中的 *NFR5* 与 *LYS11*、大豆中的 *NFR5*、榆树(*Paras-*

*ponia*)中的 *NFP* 处于同一个分支, 这些基因具有密切的亲缘关系。苜蓿中的 *NFP*、百脉根中的 *NFR5*、大豆中的 *NFR5* 均参与根瘤共生信号并作为结瘤因子受体, 而榆树中的 *PaNFP* 在菌根真菌共生过程中也起到了识别菌根真菌信号的作用, 由此推测 *LcLRK1* 可能在菌根真菌与植物共生过程中起到信号受体的作用。

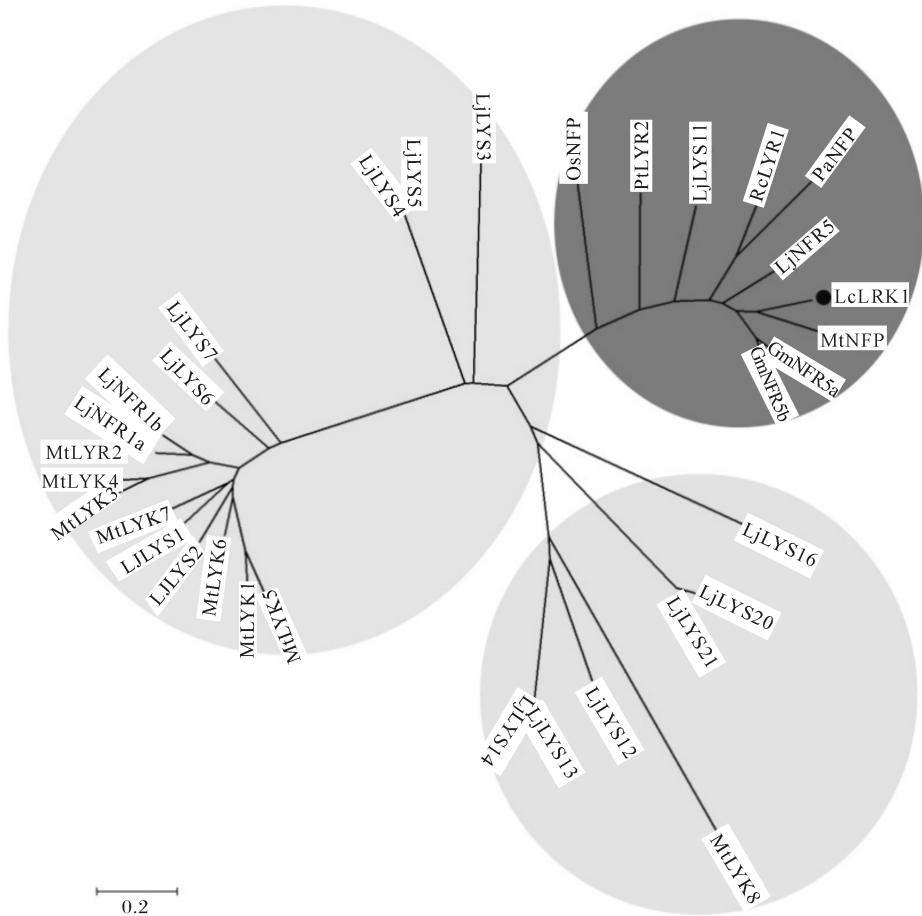


图 3 利用 N-J 法对 *LcLRK1* 氨基酸序列与其他物种 *LysM*-*RLK* 蛋白的遗传进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree of *LcLRK1* and *LysM*-*RLK* proteins in other plants by using N-J method

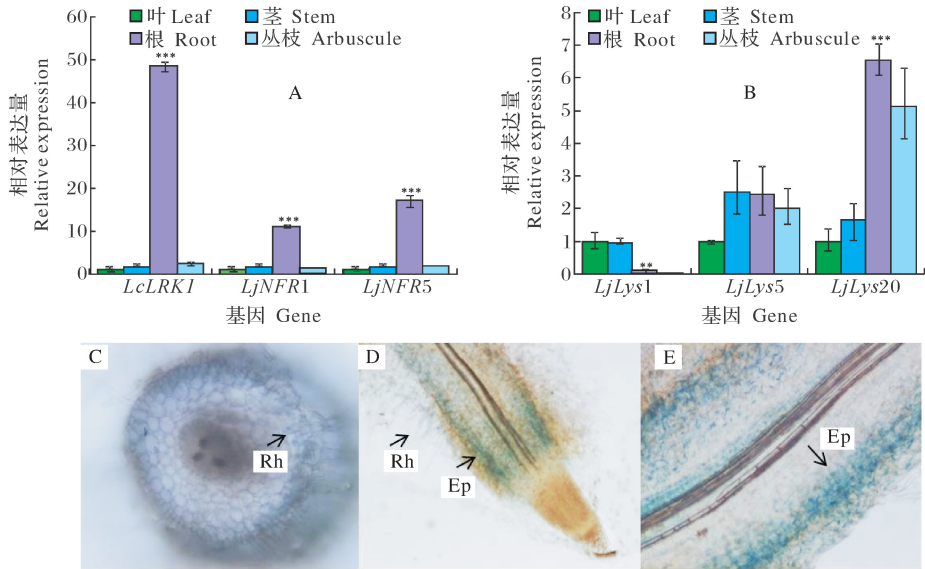
### 2.3 *LcLRK1* 表达模式与 *ProLcLRK1* :: *GUS* 组织定位

根据 *LcLRK1* 的系统进化树分析, 分别选取 *LYS I* 中的 *LjLys1*、*LjLys5* 和 *LjNFR1*, *LYS II* 中的 *LcLRK1*、*LjNFR5* 以及 *LYS III* 中的 *LjLys20* 进行基因表达分析。将百脉根分别接种菌根真菌 (*R. irregularis*) 和不接种菌根真菌, 经过 28 d 共培养后, 收获植物的叶片、茎, 未被 AM 真菌侵染的根以及被 AM 真菌侵染的根, 然后对这些基因进行转录水平分析, 结果表明第 2 亚家族 *LYS II* 中的 *LcLRK1*、*LjNFR5* 基因在根中的表达量高于叶片

和茎中的表达量(图 4A), 另一亚家族的一个与根瘤菌信号识别相关的基因 *LjNFR1*(图 4A) 在根中表达量最大, 在其他组织中表达量很低; 同一亚家族的 *LjLys1*(图 4B) 在叶片表达量最大, 其次是茎, 在根中的表达量很低, 而与其来自同一亚家族的 *LjLys5* 则是在茎和根中的表达量较高, 叶片中的表达量相对下降; 来自第 3 亚家族的基因 *LjLys20*(图 4B) 在接种 AM 真菌和未接种 AM 真菌的根中的表达量较高。在接种 AM 真菌 10 d 以后, *LcLRK1* 基因的表达量比没有接种 AM 真菌的根样要低, 推测 *LcLRK1* 基因发挥作用可能是在根中以及 AM 共

生早期。通过对基因在不同组织中的表达分析,发现 *LcLRK1* 与 *NFR1*、*NFR5* 基因的表达模式类似,均在根组织中大量表达,而 *NFR1*、*NFR5* 是与结瘤因子信号识别相关的基因,因此推测 *LcLRK1* 编码的蛋白质与 *NFR1*、*NFR5* 蛋白质是一类相似的受体蛋白。为进一步验证 *LcLRK1* 基因的表达与

菌根真菌侵染相关,将 *LcLRK1* 基因上游 1.2 kb 长度的片段与 *GUS* 报告基因融合,构建了 *ProLcLRK1::GUS* 重组质粒。通过农杆菌介导的毛根转化的方法,将带有重组质粒的农杆菌转化到百脉根中,检测 *GUS* 酶活性(图 4C、D、E),发现在根表皮细胞中以及根毛基部出现 *GUS* 信号,表明



A-B: *LcLRK1* 及其同源基因在不同组织中的表达水平; 误差线是指平均值的标准差(生物重复为 3), \* \*  $P < 0.01$ , \* \* \*  $P < 0.001$ ; C-E: 转 *ProLcLRK1::GUS* 质粒的百脉根组织化学染色, 在根毛(C)和表皮细胞(D-E)中检测到蓝色信号; Arbuscule 表示含有丛枝的根组织; Rh 表示根毛; Ep 表示表皮细胞。A-B: The expression levels of *LcLRK1* and its homologous genes in various tissues. Error bars represented SD of the means ( $n = 3$ ). \* \*  $P < 0.01$ , \* \* \*  $P < 0.001$ ; C-E: Histochemical *GUS* staining of *L. corniculatus* roots expressing *ProLcLRK1::GUS*. C: Blue staining is detected in the root hairs and epidermis; D-E: Arbuscule indicated the roots containing arbuscules; Rh indicated hairs; Ep indicated epidermis.

图 4 *LcLRK1* 及其同源基因在不同组织中表达和 *LcLRK1* 基因的组织定位

Fig.4 Expression patterns of *LcLRK1* and its homologs in the variant tissues from *L. corniculatus* and the localization of *LcLRK1* gene in roots

*LcLRK1* 基因在根表皮细胞以及根毛基部表达。

## 2.4 *LcLRK1* 基因在 AM 共生时期的表达模式

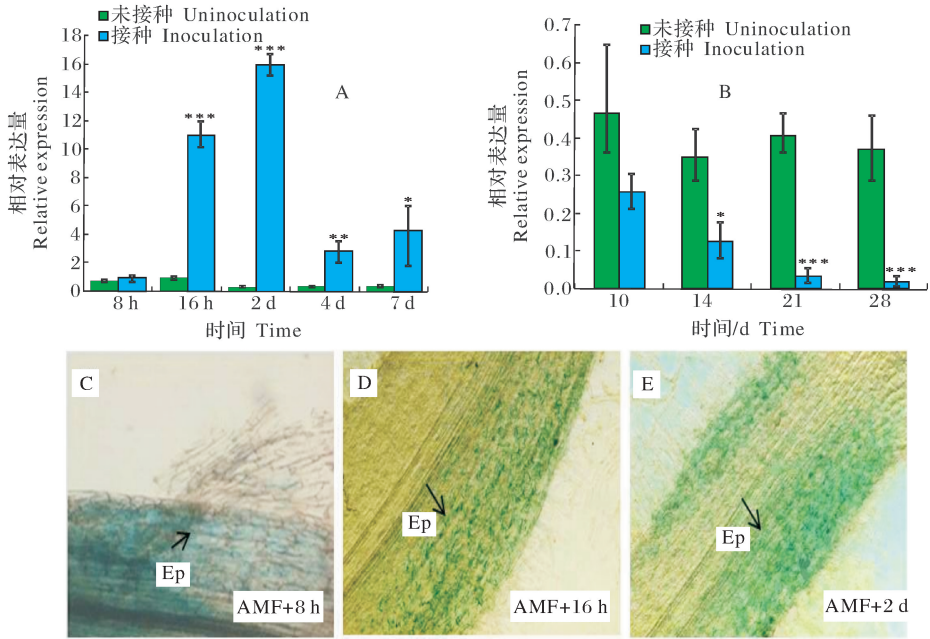
将生长状况一致的百脉根幼苗转移至盆栽体系中, 试验组接种 AM 真菌 *R. irregularis*, 对照组不接种 AM 真菌, 分别于接种后 8、16 h, 1、2、4、7、10、14、21、28 d 取样, 进行定量 RT-PCR(图 5A、B)。结果表明, *LcLRK1* 基因的表达量在接种 AM 真菌的早期(16 h~7 d)上调表达; 对根样进行 TB 染色, 发现在接种后 7~10 d 根的表面形成大量的附着胞, 丛枝已经在皮层细胞中开始形成, 综上, 可以推测 *LcLRK1* 是一个与 AM 菌根共生相关的基因, 但随着丛枝大量形成后, *LcLRK1* 基因的表达在根中显著下降。进一步检测 *LcLRK1* 基因启动子驱动的 *GUS* 报告基因在根中的表达情况, 结果显示: 在接种 AM 真菌 16 h~2 d, 在根表皮细胞中出现较强

的 *GUS* 信号(图 5D、E), 而在接种 AM 真菌 8 h 后的根中的 *GUS* 信号较弱(图 5C), 该结果表明 *LcLRK1* 基因可能在与 AM 真菌共生的早期发挥作用, 可能与 AM 真菌的信号识别有关。

## 2.5 *LcLRK1* 基因沉默影响 AM 真菌侵染和丛枝结构形成

*LcLRK1* 的 RNAi 导致 *R. irregularis* 的侵染率、侵染强度和丛枝数量均显著下降, 对照组中侵染强度很高, 并且在对照组的根中, 发现植物根细胞中丛枝的数量也很多(图 6A、B); 而基因沉默植株中, 根段的侵染率以及丛枝丰度明显下降(图 6C、D), 而且丛枝的分支程度低或者只形成初级的丛枝主干(Trunk)(图 6D), 因此, *LcLRK1* 基因的沉默阻碍了丛枝的发育。为了进一步研究 *LcLRK1* 基因的功能, 通过定量 RT-PCR 检测转基因植株中 *LcLRK1*

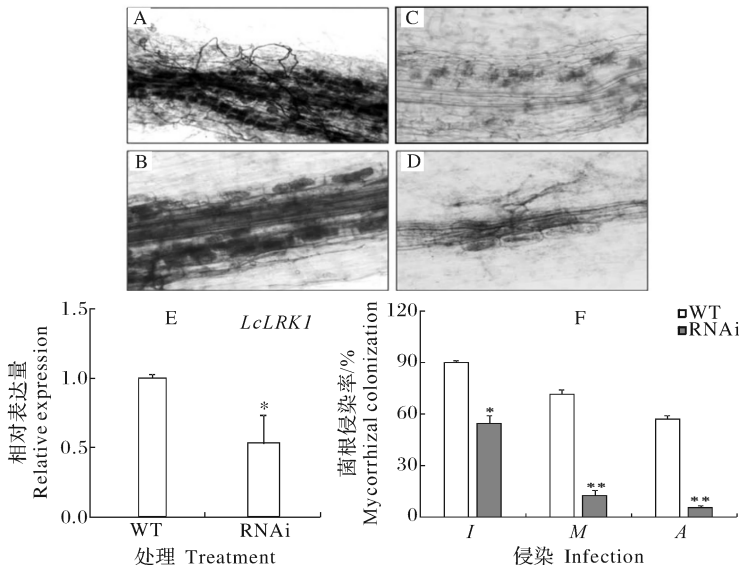




A: 在共生早期(8 h~7 d), *LcLRK1* 基因在根中的表达模式; B: 在共生时期(10~28 d), *LcLRK1* 基因在根中的表达模式; 误差线是指平均值的标准差(生物重复为 3), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; C-E: 在接种 AM 真菌后 8 h (C), 16 h (D) 和 2 d (E) 后, *LcLRK1* 基因在根表皮细胞中诱导表达。Ep: 表皮细胞。A: Expression pattern of *LcLRK1* gene in roots at 8, 16 h, 2, 4, 7 d; B: Expression pattern of *LcLRK1* gene in roots at 10, 14, 21, 28 d. Error bars represented SD of the means ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; C-E: Histochemical GUS staining of *L. corniculatus* roots expressing *ProLcLRK1::GUS*. Blue staining is detected in the root epidermis after 8 h (C), 16 h (D) or 2 d (E) inoculation. Ep: Epidermal cells.

图 5 *LcLRK1* 基因在 AM 共生早期以及共生时期的表达模式

Fig.5 The expression patterns of *LcLRK1* gene in roots at early and symbiotic stages of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis



A-B: 对照组根中的 AM 表型; C-D: RNAi 根中的 AM 表型; E: *LcLRK1* 基因的沉默效率; F: RNAi 与 WT 对照组根中的菌根真菌总的侵染率(I)、侵染强度(M)与丛枝丰度(A); 误差线是指平均值的标准差, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。A-B: Arbuscular mycorrhizal phenotypes in control roots; C-D: Arbuscular mycorrhizal phenotypes in RNAi roots; E: The silence efficiency of *LcLRK1* gene; I: The overall fungal infection frequency; M: The intensity of infection; A: Arbuscule abundance in the control and RNAi roots. Error bars represented SD of the means \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

图 6 *LcLRK1* 基因沉默对 AM 真菌侵染与丛枝形成的影响

Fig.6 The silence of *LcLRK1* gene affects the AM fungal infection and arbuscule formation



基因的 mRNA 水平,结果表明在基因沉默植株中该基因 mRNA 的水平为对照的 54%(图 6E)。对侵染 14 d 的 *LcLRK1*-RNAi 及野生型对照根系进行 TB 染色,在显微镜下观察 AM 真菌侵染情况,用“MYCOCALC”软件计算出 AM 真菌的侵染率(*I*)、侵染强度(*M*)和丛枝丰度(*A*),统计结果如图 6F 所示,可知 *LcLRK1* 基因的干扰使得菌根的侵染率、侵染强度和丛枝丰度都发生显著性下降且与图 6A、B、C、D 所示侵染表型一致,由此可以推测,*LcLRK1* 基因的沉默阻碍了 AM 真菌的侵染与丛枝的形成,进而影响了 AM 真菌与宿主植物的菌根化过程。

### 3 讨 论

目前对 AM 真菌与植物建立丛枝菌根共生体的分子机制的了解还不够全面,尤其是对豆科植物中识别 AM 真菌释放的 Myc 因子的受体的认识还知之甚少。本研究从百脉根(*Lotus corniculatus*)中分离得到 1 个基因 *LcLRK1*,*LcLRK1* 基因编码 1 个 LysM 型蛋白激酶。在现有的研究中,发现杨树中 PaNFP 同时作为结瘤因子和菌根因子信号分子的受体<sup>[16]</sup>,*PaNFP* 基因编码的蛋白质也是一类 LysM 型受体激酶,*LcLRK1* 编码的蛋白质与 *PaNFP* 编码的蛋白质相似,而 LysM 型蛋白是一类与结瘤因子信号或菌根真菌信号分子识别相关的受体激酶<sup>[24-25]</sup>,因此推测,*LcLRK1* 基因编码的蛋白质是一类受体蛋白。通过基因表达分析,发现 *LcLRK1* 基因主要在根中表达,目前发现的结瘤因子的受体 *LjNFR1*、*LjNFR5* 基因表达也主要在根部组织表达<sup>[31]</sup>,本研究通过构建 Pro*LcLRK1* :: *GUS* 重组质粒并用组织化学染色法,发现 *LcLRK1* 基因在根表皮细胞以及根毛中表达,因此,可以推测 *LcLRK1* 基因有可能具有受体的功能。

百脉根含有多个类似 *MtNFP*/*LjNFP* 的基因<sup>[30]</sup>,为了探明本研究分离的新基因 *LcLRK1* 是否对 AM 真菌侵染和丛枝形成起作用,利用反向遗传学 RNAi 技术,对该基因进行功能分析。在接种 AM 真菌 14 d 后,在 *LcLRK1* RNAi 沉默和对照组根中的侵染率和侵染强度有明显差异;并且,*LcLRK1* 基因沉默阻止了丛枝的形成,然而对照组根中的丛枝结构正常;因此,*LcLRK1* 基因在 AM 菌根共生早期的信号转导途径中发挥重要作用。这一结果与榆树中 *PaNFP* 作为菌根型受体激发菌

根共生信号的功能相似<sup>[16]</sup>,然而 *LcLRK1* 与 *LjNFR1/5* 及 *MtNFP*、*MtLYK3* 的功能不同,*LjNFR1/5* 与 *MtNFP*/*MtLYK3* 主要是识别结瘤因子的受体激酶,参与根瘤共生信号途径,影响根瘤的形成<sup>[25-26]</sup>。因此,提出这样一个科学假设:由于 My-LCOs 因子与 Nod 因子有着极其相似的结构特征<sup>[23]</sup>,并且 Nod 因子的受体是 LysM 型受体激酶<sup>[25]</sup>,*LcLRK1* 与 *PaNFP* 能够募集菌根共生信号,因此 My-LCOs 因子的受体很可能是类似于 *LcLRK1* 与 *PaNFP* 的一类 LysM 型受体激酶。

本研究从百脉根中克隆得到了 *LcLRK1* 基因,并且发现该基因在丛枝菌根形成过程中发挥着重要作用。因此,*LcLRK1* 基因可能是识别 Myc 因子的一类 LysM 型受体激酶,刺激菌根共生信号的形成,参与丛枝形成过程,从而促进植物菌根化进程。

### 参 考 文 献

- [1] SCHÜBLER A, SCHWARZOTT D, WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution[J]. *Mycological research*, 2001, 105: 1414-1421.
- [2] HEIJDEN M G A, KLIRONOMOS J N, URSIC M, et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity[J]. *Nature*, 1998, 396: 69-72.
- [3] SOLAIMANAN M Z, SAITO M. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry[J]. *New phytologist*, 1997, 136(3): 533-538.
- [4] WANG B, QIU Y L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants[J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(5): 299-363.
- [5] BEHIE S W, BIDOCHKA M J. Nutrient transfer in plant-fungal symbioses[J]. *Trends in plant science*, 2014, 19(11): 734-740.
- [6] BAGO B, PFEFFER P E, ABUBAKER J, et al. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1496-1507.
- [7] HEIJDEN M G A, SCHEUBLIN T R. Functional traits in mycorrhizal ecology: their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning[J]. *New Phytol*, 2007, 174(2): 244-250.
- [8] AKIYAMA K, MATSUZAKI K, HAYASHI H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Nature*, 2005, 435: 824-827.
- [9] KOSUTA S, CHABAUD M, LOUGNON G, et al. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*

- ula[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 952-962.
- [10] KUHN H, KÜSTER H, REQUENA N. Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula* [J]. *New Phytol*, 2010, 185: 716-733.
- [11] MAILLET F, POINSOT V, ANDRÉ O, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza [J]. *Nature*, 2011, 469: 58-63.
- [12] HARRISON M J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 19-42.
- [13] GENRE A, CHABAUD M, TIMMERS T, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection [J]. *Plant cell*, 2005, 17: 3489-3499.
- [14] GENRE A, CHABAUD M, FACCIO A, et al. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota* [J]. *Plant cell*, 2008, 20: 1407-1420.
- [15] GIANINAZZI-PEARSON V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhiza fungi: getting to the roots of the symbiosis [J]. *Plant cell*, 1996, 8: 1871-1883.
- [16] OP DEN CAMP R, STRENG A, DE MITA S, et al. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in non-legume *Parasponia* [J]. *Science*, 2011, 331(6019): 909-912.
- [17] CATOIRA R, GALERA C, DE BILLY F, et al. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway [J]. *Plant cell*, 2000, 12: 1647-1666.
- [18] PUMPLIN N, MONDO S J, TOPP S, et al. *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant journal*, 2010, 61: 482-494.
- [19] ZHANG Q, BLAYLOCK L A, HARRISON M J. Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant cell*, 2010, 22: 1483-1497.
- [20] WANG E, SCHORNACK S, MARSH J F, et al. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants [J]. *Curr Biol*, 2012, 22: 2242-2246.
- [21] JAVOT H, VARMA PENMETS R, TERZAGHI N, et al. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 2007, 104: 1720-1725.
- [22] YANG S Y, GRONLUND M, JAKOBSEN I, et al. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the phosphate transporter 1 gene family [J]. *Plant cell*, 2012, 24: 4236-4251.
- [23] MAILLET F, POINSOT V, ANDRÉ O, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza [J]. *Nature*, 2011, 469: 58-63.
- [24] LIMPENS E, FRANKEN C, SMIT P, et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection [J]. *Science*, 2003, 302: 630-633.
- [25] RADUTOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases [J]. *Nature*, 2003, 425: 585-592.
- [26] ARRIGHI J, BARRE A, BEN AMOR B, et al. The *Medicago truncatula* LysM-receptor kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 265-279.
- [27] MADSEN E B, ANTOLIN-LLOVERA M, GROSSMANN C, et al. Autophosphorylation is essential for the *in vivo* function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5 [J]. *Plant journal*, 2011, 65: 404-417.
- [28] BROGHAMMER A, KRUSELL L, BLAISE M, et al. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding [J]. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 2012, 109: 13859-13864.
- [29] PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, LEFEBVRE B, KOINI M A, et al. Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in *Nicotiana benthamiana* induces defence-like responses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65055.
- [30] DE MITA S, STRENG A, BISSELING T, et al. Evolution of a symbiotic receptor through gene duplications in the legume-rhizobium mutualism [J]. *New phytologist*, 2013, 201(3): 961-972.
- [31] LOHMANN G V, SHIMODA Y, NIELSEN M W, et al. Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2010, 23(4): 510-521.
- [32] GOMEZ S K, JAVOT H, DEEWATTHANAWONG P, et al. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *BMC plant biology*, 2009, 9: 10. doi: 10.1186/1471-2229-9-10
- [33] YOUNG N D, DEBELLE F, OLDROYD G E D, et al. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses [J]. *Nature*, 2011, 480: 520-524.
- [34] CLARA L D, METTE G, HELMI R M S, et al. *Lotus japonicus* handbook: induction of hairy roots for symbiotic gene expression studies [M]. Netherlands: Springer, 2005: 261-277.
- [35] MICHAEL A F. 3'-end cDNA amplification using classic RACE [J]. *Nature protocol*, 2006, 1(6): 2742-2745.
- [36] SCOTTO-LAVINO E, DU G, FROHMAN M A. 5'-end cDNA Amplification using classic RACE [J]. *Nature protocol*, 2006, 1(6): 2555-2562.
- [37] TROUVELOT A. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle [M]//GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S. Physiological and genetical aspects of Mycorrhizae, Paris: INRA, 1986: 217-221.

## LysM receptor *LcLRK1* from *Lotus corniculatus* involved in the arbuscule formation

HAN Yachao<sup>1,2</sup> XIE Xian'an<sup>2</sup> GENG Cong<sup>2</sup> ZHAO Bin<sup>2</sup>

1.College of Biochemical Engineering, Fuyang Vocational and Technical College, Fuyang 236031, China;

2.College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** A LysM receptor *LcLRK1* gene possibly involved in Myc-factor perception was isolated from *Lotus corniculatus*. The full-length of *LcLRK1* gene was isolated from *L. corniculatus* by using the degenerate primers and RACE PCR strategies. The structure of *LcLRK1* gene was analyzed with bioinformatics. The expression profiles of *LcLRK1* gene were investigated in variant tissues from *L. corniculatus* after inoculation *Rhizophagus irregularis*. A recombinant plasmid harboring *ProLcLRK1* :: *GUS* reporter was constructed to localize *LcLRK1* in the roots of *L. corniculatus*. The *LcLRK1* gene was knock-down with RNA interference. The results showed that *LcLRK1* gene, encoding a LysM receptor kinase, was comprised of three extracellular LysM domains, a transmembrane domain and intracellular kinase domain. *LcLRK1* gene was up-regulated in roots at early stage of AM symbiosis and the transcripts of *LcLRK1* were mainly present in the root epidermis and root hairs. The knock-down of the *LcLRK1* gene significantly decreased AM fungal colonization. In RNAi lines, the infection rate and arbuscule numbers were strongly reduced compared to that in the controls. The *LcLRK1* gene may participate in the perception of Myc-factor and down-regulation of *LcLRK1*, affecting the formation of AM fungal arbuscule.

**Keywords** *Lotus corniculatus*; Myc-factor; *LcLRK1* gene; *Rhizophagus irregularis*; LysM receptor kinase; RNA interference(RNAi)

(责任编辑:张志钰)