

百脉根4个共生基因在水稻中的共表达及其对水稻转录组的影响

李文清 曹文刚 李豪 方庆 张忠明

农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为建立水稻-根瘤菌共生固氮体系,将百脉根共生信号转导途径中的4个功能基因(*LHK1*、*NSP1*、*NSP2*和*NIN*)转入水稻,获得稳定转化的转基因水稻,并初步检测转基因水稻的表型和转录组水平上的差异。根瘤菌感染试验结果显示,根瘤菌感染对照(转入空载体)和转基因水稻的根毛和表皮的比率没有显著变化,但接种根瘤菌14 d后,对照与转基因水稻的侧根原基数有显著差异,转共生基因水稻的侧根原基明显增多。利用水稻cDNA芯片,检测转基因水稻组与对照组在接种根瘤菌7 d和不接种根瘤菌条件下根的转录组变化,结果显示,转基因组与对照组水稻在植物防御反应、激素信号转导途径相关基因均有差异性表达,表明豆科共生基因影响了水稻对根瘤菌的反应。

关键词 百脉根; 根瘤共生; 转基因水稻; 根瘤菌

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0055-07

豆科植物能识别根瘤菌并形成一个新的器官——根瘤。根瘤菌在根瘤中能将空气中的氮气(N_2)还原成氨(NH_3)供植物吸收,即共生固氮。目前,从模式豆科植物(苜蓿、百脉根)中鉴定了许多与根瘤菌共生相关的功能基因^[1-5]。通过遗传学的上下位效应,推测并建立了共生途径模式图^[6]。在百脉根中,组氨酸激酶*LHK1*作为一个细胞分裂素受体对根瘤的形成具有关键作用^[7],*LHK1*在水稻中存在多种同源基因,如*OsHK1*、*OsHK2*、*OsHK3*、*OsHK4*等^[8],目前尚不清楚它们是否参与共生过程。结瘤信号通路基因*NSP1*、*NSP2*是结瘤因子信号传递所必须的关键基因,其突变均导致不结瘤^[9-10];在水稻中存在它们的同源基因,水稻的*OsNSP1*/*OsNSP2*能够分别互补百脉根相应突变体的结瘤表型^[11]。结瘤起始基因*NIN*是共生信号传递的终端,*NIN*的表达完成依赖于根瘤菌或结瘤因子诱导,其突变可中断侵入线形成和根瘤器官发生,表明*NIN*在共生中起关键作用^[12-13]。在水稻中发现了3个*NIN*相似蛋白,分别是*OsNLP1*、*OsNLP2*、*OsNLP3*,其中与*LjNIN*同源性最高且进

化距离最近的*OsNLP1*^[14]不能互补百脉根*NIN*的突变体表型。

本研究将百脉根共生信号途径下游的4个基因*LHK1*、*NSP1*、*NSP2*和*NIN*构建在同一表达载体上并转入水稻,考察豆科共生基因对水稻共生表型、根的生长和发育及转录组学的影响,旨在为建立水稻与根瘤菌的共生体系提供理论依据,并为在水稻中搭建完整的共生基因线路与后续转入共生途径上游基因(*NFR1*、*NFR5*、*SymRK*、*CCaMK*、*Cyclops*)的水稻进行杂交聚合提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

百脉根(*Lotus japonicus*)MG20,华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存;水稻(*Oryza sativa*)材料为野生型日本晴,由作物遗传改良国家重点实验室林拥军教授惠赠。百脉根根瘤菌菌株MAFF303099,为华南植物园吴国江研究员惠赠;*M. loti* MAFF303099/pHC60、*E. coli* DH5 α /*E. coli* 10B为农业微生物学国家重点实验室共生

收稿日期: 2016-09-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2010C126502); 高等学校博士学科点专项(20130146130003)

李文清,硕士研究生,研究方向: 共生固氮分子生物学. E-mail: 910250479@qq.com

通信作者: 张忠明,博士,教授,研究方向: 共生固氮分子生物学. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

固氮实验室保存;水稻愈伤转化用到的根瘤农杆菌菌株 EHA105 及表达载体 pCAMBIA1302 来源于作物遗传改良国家重点实验室。

1.2 转基因水稻材料的获得

利用表达载体 pCAMBIA1302 和中间载体 pGB35GFP,采用常规酶切酶连的方法,获得目的载体,进而获得稳定转化的转基因水稻,具体步骤见文献[15]。

1.3 共生效应考察及芯片材料的处理

分别对转基因水稻及转入空载体的对照进行浸种、催芽后移栽水培袋,用液体 YMA 培养带有绿色荧光标记的根瘤菌 *M. loti* MAFF303099/pHC60, 30 ℃培养约 24 h 后加入 200 mL 终质量浓度为 10 mg/L 的类黄酮,再培养 24 h,至 $D_{600} \approx 0.6$ 。用 $1 \times B\&D$ 稀释菌液至 $D = 0.1$,接种水稻。根据转基因组与对照组是否接种根瘤菌共获得 4 组试验材料:空载接种(CK-inoculated)、空载未接种(CK-uninoculated)、转基因接种(Tg-inoculated)、转基因未接种(Tg-uninoculated)。在接种 7 d 后,取每组试验材料的根用于 cDNA 芯片杂交,每组设 3 个生物学重复;取接种 10 d 后的样品观察表型。

表 1 cDNA 芯片样品
Table 1 cDNA microarray samples

样品编号 Sample number	样品名称 Sample name	样品信息 Sample information
1	130211Y1	空载接种,重复 1 CK-inoculated, repeat 1
2	130211Y2	空载接种,重复 2 CK-inoculated, repeat 2
3	130211Y3	空载接种,重复 3 CK-inoculated, repeat 3
4	130211N1	空载未接种,重复 1 CK-uninoculated, repeat 1
5	130211N2	空载未接种,重复 2 CK-uninoculated, repeat 2
6	130211N3	空载未接种,重复 3 CK-uninoculated, repeat 3
7	1302416YCEF	转基因接种,重复 1 Tg-inoculated, repeat 1
8	1302416YEFG	转基因接种,重复 2 Tg-inoculated, repeat 2
9	1302416YFGH	转基因接种,重复 3 Tg-inoculated, repeat 3
10	1302416NCDE	转基因未接种,重复 1 Tg-uninoculated, repeat 1
11	1302416NEFG	转基因未接种,重复 2 Tg-uninoculated, repeat 2
12	1302416NFGI	转基因未接种,重复 3 Tg-uninoculated, repeat 3

1.4 芯片杂交

每个样品设置 3 个生物学重复,将材料委托上海康成生物工程有限公司利用 Agilent Whole Genome Oligo Microarrays 进行全基因组表达分析。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻鉴定

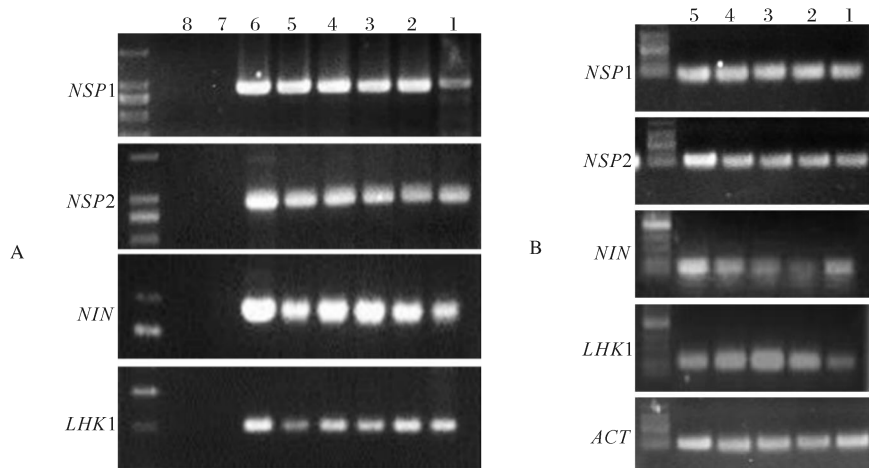
愈伤转化获得转基因水稻成苗 32 株,通过 DNA 及 RNA 水平上的检测(图 1),共鉴定出阳性苗 5 株,全部收到种子。

2.2 根瘤菌对转基因水稻根表皮细胞的感染

利用微室培养技术,在荧光显微镜下观察了根瘤菌对转基因水稻根毛及表皮的感染过程,结果显示:转基因水稻组与对照组在接种根瘤菌 10 d 后,都能观察到根瘤菌侵入了水稻根毛和表皮细胞的现象,在被侵染的细胞中观察到根瘤菌大量繁殖以至充满整个细胞(图 2A)。为比较转基因组与对照组的表型差异,统计了根瘤菌对 41 株转基因水稻及 32 株对照组水稻侵染比例,发现根瘤菌对根毛和表皮的侵入比率没有显著差异(图 2B)。说明所转入的共生基因并没有影响根瘤菌对水稻的侵染,这种侵染有别于根瘤菌对豆科植物的侵入过程,根瘤菌虽然入侵了水稻表皮细胞,但也仅仅是侵入了单个细胞,并没有观察到成片细胞受到侵染,也没有像百脉根那样分化形成根瘤原基。在通常情况下,根瘤菌侵染豆科植物是从根毛顶端开始并导致根毛形成“牧羊拐”状,通过侵入线到达皮层^[16](图 2Aef)。而在水稻转基因组或对照组中,根瘤菌对表皮的入侵几乎全都发生在侧根或侧根原基附近,表明可能是由于侧根或侧根原基的发生导致细胞间产生“裂隙”,根瘤菌由此侵入到表皮细胞及根毛。

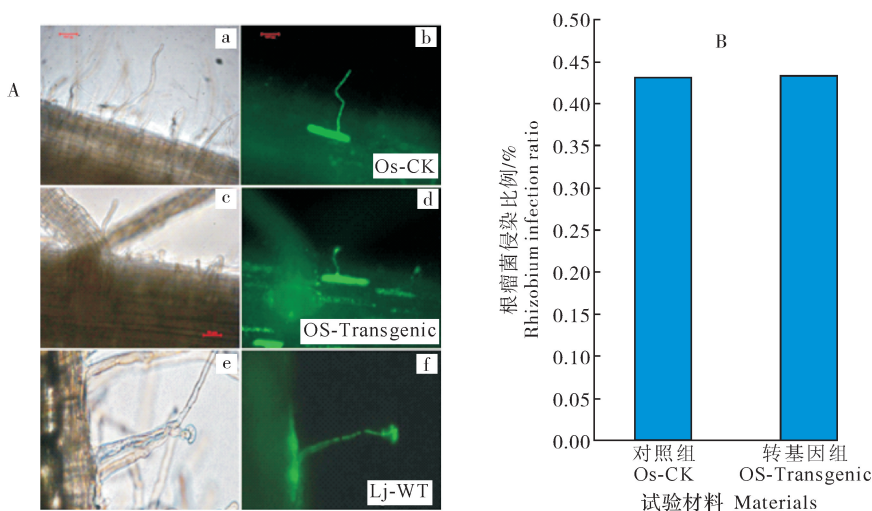
2.3 根瘤菌对转基因水稻侧根发育的影响

盆栽试验结果显示:非转基因水稻接种根瘤菌 14 d 后,侧根数量明显比未接种对照组增多,而转基因水稻接种根瘤菌后侧根数量更多(图 3A)。取 2 mm 根尖统计侧根及侧根原基数目,对照组未接种根尖 37 条,平均每条根尖侧根及侧根原基数为 1.00;对照组接种根尖 32 条,平均每条根尖侧根及侧根原基数为 2.68;转基因未接种的水稻根尖 27 条,平均每条侧根及侧根原基数为 1.67;转基因接种的水稻根尖 41 条,平均每条侧根及侧根原基数为 8.39。接种与未接种根尖之间呈现显著性统计学差异,说明根瘤菌的入侵会促进侧根及侧根原基的发



A.在 DNA 水平上进行阳性鉴定的结果:1~5 分别是 *LjNSP1*、*LjNSP2*、*LjNIN* 和 *LjLHK1* 的鉴定结果,6 是载体,7 和8 分别是野生型与水的阴性对照; B:RT-PCR 检测 4 个基因 mRNA 转录水平。A. The genes were tested at the DNA level. Line 1 to 5,identification *LjNSP1*,*LjNSP2*,*LjNIN* and *LjLHK1*,line 6 was the vector,line 7 and 8 was WT and water,respectively. B. The genes were tested by RT-PCR.

图 1 转基因水稻的鉴定
Fig.1 Identification of transgenic rice



A.根瘤菌侵染水稻根系观察;a 和 b 是对照组(Os-CK),c 和 d 是转基因组(Os-Transgenic),2 组图片都是接种根瘤菌 10 d 后拍摄;e 和 f 是百脉根接种根瘤菌 14 d 后的情况;a,c,e 是在明场下观测,b,d,f 是在荧光显微镜下观测。B.Os-CK 与 Os-Transgenic 在接种根瘤菌 10 d 后于荧光显微镜下观测到的结果统计。A.Observation of rhizobium infection:a and b were the control group(Os-CK),c and d were the transgenic group(Os-Transgenic),both of them were inoculated with rhizobium for 10 days;e and f were *Lotus japonicas* that were inoculated with rhizobium for 14 days. a,c,e were observed in bright field. b,d,f were observed in fluorescent microscope. B.The Os-CK group and Os-Transgenic group were inoculated with rhizobium for 10 days. Fluorescent microscope was applied to summarize the observed results.

图 2 根瘤菌对水稻及百脉根的入侵及根瘤菌侵染比例

Fig.2 Rhizobium infection of *O. sativa* and *L. japonicus* and the ratio of infection

生。转基因接种与对照接种组之间侧根及侧根原基数呈现显著性差异(图 3B),说明转入了共生功能基因的水稻在接受根瘤菌刺激的条件下,侧根及侧根原基数提高更明显。侧根发育受多种植物激素的调

控^[17],推测水稻侧根增多是由于其植物激素转导途径受到了影响。

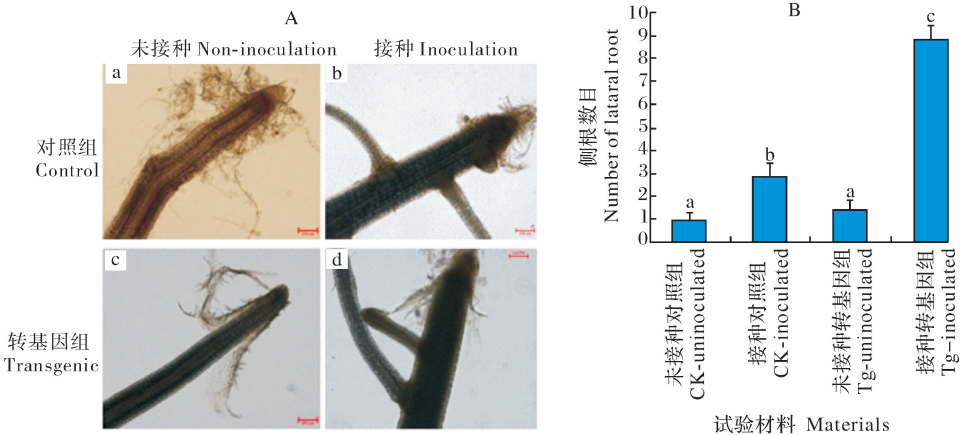
2.4 根瘤菌及豆科共生基因对水稻转录组的影响

1) 芯片数据的有效性。共种植 2 批水稻材料,

根据是否接种根瘤菌获得 4 种样本,每样本设置 3 次独立生物学重复,计算每组样本重复 2、重复 3 与重复 1 之间的相关系数,结果显示相关系数为 0.962~1.000,平均相关系数为 0.991。从芯片杂交结果中挑出 8 个差异表达的基因进行实时荧光定量 PCR,试验结果与芯片数据大致相同。

2)差异表达基因总体特征。在 Fold Change $\geq$ 2.0 的条件下,空载接种 vs 空载未接种,上调基因有

610 个,下调基因有 845 个;转基因接种 vs 转基因未接种,上调基因 3 176 个、下调基因 3 075 个;空载接种 vs 转基因接种,上调基因 5 197 个,下调基因 4 412 个;空载未接种 vs 转基因未接种,上调基因 546 个,下调基因 842 个(图 4)。其中转基因接种的样本与对照样本比较,差异表达基因的数量明显高于其他组,说明接种根瘤菌后,转入相关共生基因的水稻其转录组水平的变化更加显著。

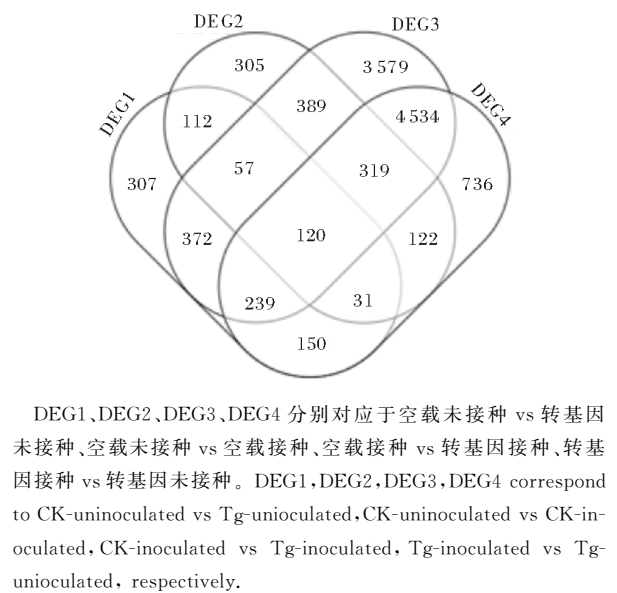


A.接种根瘤菌 14 d 后水稻侧根表型观察:a 是未接种根瘤菌的对照组;b 是接种根瘤菌的对照组;c 是未接种根瘤菌的转基因组;d 是接种根瘤菌的转基因组;标尺为 100 μ m。B.转基因组与对照组侧根数量的变化:接种根瘤菌 14 d 后,侧根数量显著上升。A.Observation of rice lateral root after inoculation with rhizobium 14 days;a.Control-uninoculated group; b.Control-inoculated group; c.Transgenic-uninoculated group; d.Transgenic-inoculated group; Bars=100 μ m。B.The change of lateral root number between transgenic group and control group;after inoculated with rhizobium for 14 days,lateral root number had increased significantly.

图 3 根瘤菌影响水稻侧根发育观察

Fig.3 Observation of rhizobium affecting rice lateral root development

3)植物激素信号转导途径中相关基因表达的变化。在对各个组别的差异基因进行 GO(gene ontology)分析及代谢途径富集(数据未显示)的基础上,发现在转基因接种 vs 转基因未接种、转基因接种 vs 空载接种、转基因未接种 vs 空载未接种中都富集到了植物激素信号转导途径相关基因。在转基因接种 vs 转基因未接种中,生长素信号途径、细胞分裂素信号途径、脱落酸信号途径、乙烯信号途径、油菜素甾醇信号途径、水杨酸信号途径中的相关 25 个基因发生上调,明显高于转基因未接种 vs 空载未接种;而在转基因接种 vs 空载接种中,有 36 个基因上调表达(表 2)。比较植物激素信号转导途径相关的基因差异表达的变化,转基因接种>转基因未接种>空载未接种 $\approx$ 空载接种,说明豆科共生基因 *LHK*、*NSP1*、*NSP2*、*NIN* 及根瘤菌都可以改变水稻中植物激素代谢水平及平衡。



DEG1、DEG2、DEG3、DEG4 分别对应于空载未接种 vs 转基因未接种、空载未接种 vs 空载接种、空载接种 vs 转基因接种、转基因接种 vs 转基因未接种。DEG1,DEG2,DEG3,DEG4 correspond to CK-uninoculated vs Tg-uninoculated,CK-uninoculated vs CK-inoculated,CK-inoculated vs Tg-inoculated,Tg-inoculated vs Tg-uninoculated, respectively.

图 4 各组间差异表达基因数(变化倍数 $\geq$ 2.0)

Fig.4 Numbers of differential expressed genes

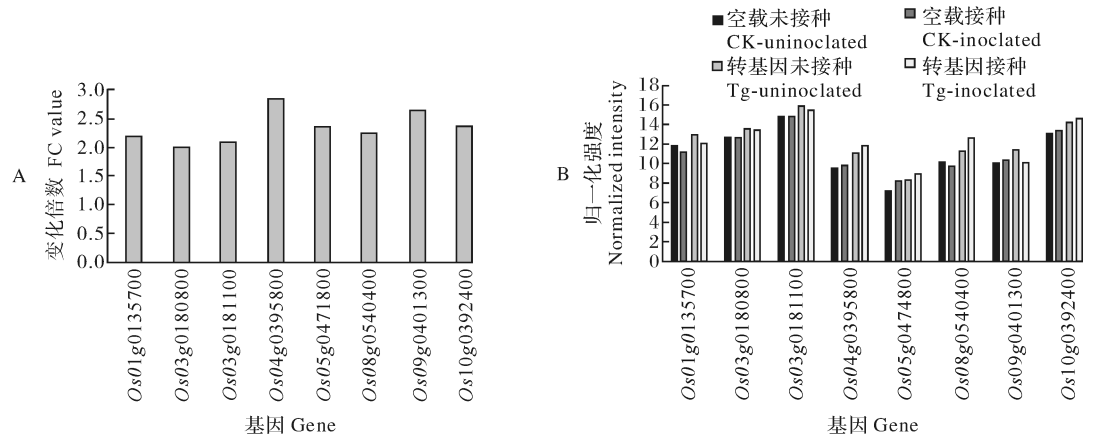
表 2 植物激素信号转导途径上调基因计数

Table 2 Numbers of up-regulated genes by plant hormone signal transduction

组别名称 Group name	基因计数 Number of genes
转基因未接种 vs 空载未接种 Tg-inoculated vs CK-inoculated	10
转基因接种 vs 转基因未接种 Tg-inoculated vs Tg-uninoculated	25
转基因接种 vs 空载接种 Tg-uninoculated vs CK-uninoculated	36

4)植物防御反应相关的基因表达情况。植物中乙烯、水杨酸、茉莉酸信号转导途径都参与植物防御反应^[18]。在转基因未接种 vs 空载未接种中,乙烯、茉莉酸信号得到放大;转基因接种 vs 转基因未接种中,乙烯、水杨酸信号得到放大,这是由于根瘤菌的

刺激所致。而在空载接种 vs 空载未接种的比对中,没有植物激素转导途径相关基因的富集,说明只有转基因的水稻在受到根瘤菌刺激后防御反应相关的激素信号才会发生变化。植物体受到外界的病原微生物侵染会产生并积累一类抗菌小分子物质—植物抗毒素。植物抗毒素在植物体内含量往往不高,但在抗菌活性上表现得很突出,是植物防御体系的重要组成部分^[19]。在 GO 分析结果中,接种与未接种根瘤菌组、转基因水稻与空载组,植物抗毒素代谢相关的基因均发生了上调。说明根瘤菌是作为外源的病原菌为水稻所识别,而外源共生基因的表达对水稻的影响与根瘤菌对水稻的刺激有相似之处。在转基因未接种 vs 空载未接种的比对中,发现转基因组相较于对照组,CDPK、CaM/CML等在植物抗病



A.植物激素信号转到途径中差异表达的基因的变化。B. 植物激素信号转到途径中差异表达的基因的归一化强度。A.The FC value of differentially expressed genes in plant hormone signal transduction. B.The normalized intensity of differentially expressed genes in plant hormone signal transduction.

图 5 植物-病原菌互作信号途径上调基因的变化及其归一化强度

Fig.5 The FC value and normalized intensity of up-regulated genes by differentially expressed genes in plant-pathogen interaction

信号途径中共有 8 个基因上调表达(图 5),说明共生基因确实与根瘤菌侵染有关并导致植物防御反应相关基因上调表达。

3 讨论

在豆科植物百脉根中 LHK1 是一个组氨酸激酶,其功能缺失突变导致不结瘤,而功能获得性突变则在没有根瘤菌存在条件下自发结瘤^[20]。在共生途径中,结瘤信号通路基因 NSP1、NSP2 编码 GARS 类转录因子,其基因突变导致侵入线延伸和根瘤原基形成受阻,NSP1 和 NSP2 蛋白定位在细胞核中,形成同源和异源二聚体共同调节启动结瘤

NIN 基因等的表达^[21]。NIN 基因表达完全依赖根瘤菌侵染或结瘤因子调控,是早期根瘤菌共生信号途径的终端,是整合和调控根瘤发生、细菌侵入及根瘤形成的关键调控子^[12]。本研究将上述 4 个基因导入水稻并共表达,考察了它们对水稻共生、根发育和转录组的影响。根瘤菌侵染试验结果表明,外源共生基因并没有改善水稻对根瘤菌的识别,但刺激了侧根原基的形成。而侧根原基的形成和发育与植物激素水平,特别是生长素和细胞分裂素的水平和比例密切相关。已有的研究表明,生长素含量高有利于根的生长发育,而细胞分裂素含量高则有利于侧根原基的形成^[7]。根瘤是一个新器官,也被认

为是一个畸形发育的侧根。因此,外源共生基因导致水稻侧根原基增多,有可能为诱导水稻产生根瘤原基提供微环境。水稻转录组分析数据也表明,外源基因导致植物激素信号相关基因上调表达。

在豆科植物与根瘤菌共生过程中,根瘤菌入侵豆科植物根表面时,会诱导植物产生短暂的防御反应,随后根瘤菌会通过多种方式抑制植物的免疫反应,而植物也会通过多种机制抑制自身免疫反应^[22-23]。本研究中转录组分析表明,在接种根瘤菌后,植物防御反应相关基因发生了上调,说明水稻将根瘤菌识别为病原菌并启动了免疫防御反应,而在水稻中这种免疫防御反应并不能被感染的根瘤菌所抑制。为了在水稻中搭建与根瘤菌共生的基因线路,使水稻具有识别根瘤菌及结瘤因子的功能,笔者所在实验室已将百脉根共生信号途径上游基因 *NFR1*、*NFR5*、*SYMRK*、*CCaMK* 和 *CYCLOPS* 构建在同一表达载体上,导入水稻并获得转基因材料,后续研究在进行中。

本研究所获得的转基因水稻将上述转基因材料进行杂交聚合,获得含有完整豆科共生途径基因的水稻新材料,为探索建立水稻-根瘤菌共生固氮体系提供了理论依据和技术资料。

致 谢 感谢作物遗传改良国家重点实验室的林拥军教授、熊立仲教授、凌飞博士等对水稻种植、愈伤转化、Southern blot 等实验提供的指导和帮助;感谢信息学院生物信息学专业的柳焱硕士对整理及分析基因芯片数据提供的帮助和支持。

参 考 文 献

- [1] GIBSON K, KOBAYASHI H, WALKER G C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection[J]. Annual review of genetics, 2008, 42: 413-441.
- [2] OLDROYD G E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J]. Nature reviews microbiology, 2013, 11(4): 252-263.
- [3] 张晓媛, 王建云, 魏丰, 等. 紫云英根瘤中特异表达 CCPs 基因的同源分析及表达定位[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 48-55.
- [4] 路达, 彭杰丽, 谢福莉, 等. 华癸中慢生根瘤菌 7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4): 56-61.
- [5] 李振鹏, 马春草, 谢福莉, 等. 华癸中慢生根瘤菌 7653R SraG sRNA 的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 51-57.
- [6] KOUCHI H, IMAIZUMI-ANRAKU H, HAYASHI M, et al. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground[J]. Plant & cell physiology, 2010, 51(9): 1381-1397.
- [7] OLDROYD G E, MURRAY J D, POOLE P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis[J]. Annual review of genetics, 2010, 45(1): 119-144.
- [8] ITO Y, KURATA N. Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice[J]. International journal of neuropsychopharmacology, 2006, 382: 57-65.
- [9] PETER K, CYNTHIA G, ANNE E, et al. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators[J]. Science, 2005, 308(5729): 1786-1789.
- [10] PATRICK S, JOHN R, VLADIMIR P, et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription[J]. Science, 2005, 308(5729): 1789-1791.
- [11] YOKOTA K, SOYANO T, KOUCHI H, et al. Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice[J]. Plant & cell physiology, 2010, 51(9): 1436-1442.
- [12] SCHAUER L, ROUSSIS A, STILLER J, et al. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules[J]. Nature, 1999, 402(6758): 191-195.
- [13] BORISOV A Y, MADSEN L H, TSYGANOV V E, et al. The Sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of Nin from *Lotus japonicus* [J]. Plant physiology, 2003, 131(3): 1009-1017.
- [14] SCHAUER L, WIELOCH W, STOUGAARD J. Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus* [J]. Journal of molecular evolution, 2005, 60(2): 229-237.
- [15] 曹文刚. 共生转录因子表达载体的构建及转基因水稻培育[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [16] MADSEN L H, TIRICHINE L, JURKIEWICZ A, et al. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus* [J]. Nature communications, 2010, 1(1): 1-12.
- [17] 邢国芳, 冯万军, 牛旭龙, 等. 植物激素调控侧根发育的生理机制[J]. 植物生理学报, 2015, 51(12): 2101-2108.
- [18] 徐刚, 姚银安. 水杨酸、茉莉酸和乙烯介导的防卫信号途径相互作用的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(1): 48-51.
- [19] 姜晓华, 丁宇. 黄烷酮类植物抗毒素的研究简介[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, 34(4): 427-432.
- [20] TIRICHINE L, SANDAL N, MADSEN L H, et al. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis[J]. Science, 2007, 315(5808): 104-107.
- [21] 张恒, 尹珺, 张晴, 等. 百脉根组氨酸蛋白激酶 LHK1 的表达及活性鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 59-63.
- [22] ZAMIOUDIS C, PIETERSE C M. Modulation of host immuni-

ty by beneficial microbes[J]. Molecular plant-microbe interactions,2012,25(2):139-150.

[23] SAEKI K. Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation:a focus on two legume-rhizobium model systems[J]. Cellular & molecular life sciences,2011,68(8):1327-1339.

Coexpression of four symbiotic genes from *Lotus japonicus* in rice and its effects on rice transcriptome

LI Wenqing CAO Wengang LI Hao FANG Qing ZHANG Zhongming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To explore the possibility of establishing the rice-rhizobium symbiotic nitrogen fixation system, four genes (*LHK1*, *NSP1*, *NSP2* and *NIN*) of symbiosis signaling in *Lotus japonicus* were co-transformed into rice. Transgenic rice plants were obtained. After inoculation with rhizobium, there was no significant difference in the root hairs and epidermis infected by rhizobia of the control and the transgenic plants. The number of lateral root and primordia in transgenic plants was significantly increased compared with those in the control after inoculation 14 days. The results of transcriptional analysis using rice cDNA microarray showed that expression of those genes involved in plant defense response and phytohormone signaling was significantly up-regulated in the transgenic plants. It is indicated that leguminous symbiotic genes affect rice response to rhizobia.

Keywords *Lotus japonicus*; root nodule symbiosis; transgenic rice; rhizobia

(责任编辑: 张志钰)