

百脉根 *Rboh* 基因家族在共生固氮中的功能研究

凌 颖 张婷婷 端木德强 张忠明 曹扬荣

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

摘要 为探索植物呼吸爆发氧化酶(respiratory burst oxidase homologue, *Rboh*)基因家族在共生固氮中的功能和作用机制,利用分子生物学、细胞生物学和遗传学等方法,围绕百脉根 *Rboh* 基因家族中在根瘤中特异性表达的基因 *LjRbohA* (Lj5g3v1497840)以及在根瘤中高表达的基因 *LjRbohB* (Lj6g3v1549190)和 *LjRbohC* (Lj5g3v1497820),分别对其蛋白的亚细胞定位、基因的表达模式、基因的启动子活性及蛋白的功能进行了研究。结果显示:*LjRbohA*、*LjRbohB*和 *LjRbohC* 蛋白都定位在植物的细胞膜上;*LjRbohA*、*LjRbohB*和 *LjRbohC* 基因在接种根瘤菌后表达上调;*LjRobhA*和 *LjRobhB* 基因在根瘤、维管束和侧根原基表达;利用 CRISPR-Cas9 技术对 *LjRbohA*、*LjRbohB*和 *LjRbohC* 3 个基因分别进行敲除导致结瘤数目减少。这些研究结果表明, *LjRbohA*、*LjRbohB*和 *LjRbohC* 这 3 个基因可能都参与调控百脉根与根瘤菌的共生结瘤过程。

关键词 百脉根; 共生固氮; 植物呼吸爆发氧化酶; 活性氧; 根瘤

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0001-09

生物固氮在农林业生产和氮素的生态系统平衡中发挥着重要作用^[1]。共生固氮体系是自然界中最重要的生物固氮体系,其突出的特点就是在豆科植物和微生物共生互作过程中形成根瘤,根瘤菌生活在根瘤中,它们能将氮气转化为氨供植物吸收利用,同时植物为根瘤菌提供生长繁殖所需要的碳源营养。豆科植物根瘤的形成是一个复杂的过程,在根瘤菌与豆科植物中存在着复杂的信号通路^[2-5]。大量研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为重要的信号分子参与植物的生长、发育、抗逆和植物—微生物的互作过程^[6-12]。植物呼吸爆发氧化酶 *Rbohs* (respiratory burst oxidase homologues, *Rbohs*)是产生 ROS 的主要来源^[13]。植物中 *Rboh* 以基因家族的形式存在^[14],在拟南芥中有 10 个 *Rboh* 基因(*AtRbohA-J*),研究表明,拟南芥中 *AtRbohA-J* 表现出不同的组织器官特征;*AtRbohD*和 *AtRbohF* 在植株的所有部位均表达, *AtRbohA-G*和 *AtRbohI* 在植株的根中特异性表达,而 *AtRbohH*和 *AtRbohJ* 在植株的花粉中特异性表达。拟南芥 *Rboh* 基因家族各成员在植株器官表达上的差异,表明各成员在生物学功能上存在一定的差异^[15]。

本研究通过分析豆科植物中 *Rboh* 系统进化树及百脉根中 *Rboh* 基因的表达图谱,发现百脉根中 *RbohA* (Lj5g3v1497840)在根瘤中特异表达, *RbohB* (Lj6g3v1549190)和 *RbohC* (Lj5g3v1497820)在根瘤中高表达,推测 *RbohA*、*RbohB*和 *RbohC* 可能在共生固氮中发挥重要作用,并围绕上述 3 个基因研究其蛋白的亚细胞定位、基因的表达模式、基因的启动子活性和蛋白的功能,并观察统计其共生结瘤表型,旨在进一步完善豆科植物与根瘤菌之间的共生信号通路,并为进一步理解活性氧在调控共生固氮中的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

百脉根(*Lotus japonicus*) MG20 生态型种子、烟草(*Nicotiana benthamiana*) 种子、发根农杆菌 *Agrobacterium. rhizogenes* LBA1334、根癌农杆菌 *Agrobacterium. tumefaciens* EHA105、百脉根根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存;中间载体 pBluescript-LjU6 和毛根转化载体 pCambia1300-

收稿日期: 2018-05-08
基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100700);国家自然科学基金项目(31370278)
凌 颖, 硕士研究生, 研究方向: 共生固氮分子生物学. E-mail: 1552704051@qq.com
通信作者: 曹扬荣, 博士, 教授. 研究方向: 共生固氮分子生物学. E-mail: yrcao@mail.hzau.edu.cn

sGFP-Cas9 由笔者所在实验室改造而得^[16-17]。

1.2 sgRNA 引导序列设计

通过网站 (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>)^[18] 筛选 sgRNA 序列。综合分析软件提供的 sgRNA 分值、靠前外显子区域和潜在脱靶位点等条件,对每个基因选择 4 个靶位点,设计对应的 4 个 sgRNA 序列。

1.3 构建用于毛根转化的 CRISPR-Cas9 敲除载体

1) 敲除单基因载体构建。针对 1 个目标基因选取 4 个 sgRNA,设计 3 对特异性引物,以 PTG (polycistronic tRNA-gRNA) 为模板,PCR 扩增得到 3 个片段,用于构建 tRNA-gRNA 多顺反子 PTG。将载体 pBluescript SK(+)-LjU6 用 *Bbs* I 单酶切线性化后与上述 3 个片段用 Gibson 方法连接,即构建好中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6-tRNA-sgRNA。进一步用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切中间载体,回收酶切下来的 LjU6-tRNA-sgRNA 片段,并连接到用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切过的最终载体 pCambia1300-sGFP-Cas9 上。得到包含 4 个 sgRNA 的百脉根毛根转化单基因敲除载体。

2) 同时敲除 2 个基因和 3 个基因载体构建。先分别构建 1 个基因敲除中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6-tRNA-sgRNA,用 *Kpn* I 和 *Spe* I 双酶切该载体并回收载体骨架,用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切第 2 个基因的中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6-tRNA-sgRNA,回收酶切下来的 LjU6-tRNA-sgRNA 片段,将该片段通过酶切酶连的方式连接到载体骨架上(*Spe* I 和 *Xba* I 是同尾酶),即通过将 2 个结构单元 LjU6-tRNA-sgRNA 串联在一起,实现 2 个基因的同时敲除。最后再将串联 2 个结构单元 LjU6-tRNA-sgRNA 连接到最终载体 pCambia1300-sGFP-Cas9 上,即构建了具有 2 个 LjU6-tRNA-sgRNA 启动单元的包含 8 个 sgRNA 百脉根毛根转化 2 个基因敲除载体。同理还可以构建包含 12 个 sgRNA 的百脉根毛根转化 3 个基因敲除载体。

1.4 烟草叶片瞬时表达植物蛋白

1) 配制菌悬缓冲液。50 mL 10 mmol/L MgCl₂ 中加 500 μ L 1 mol/L MES 和 100 μ L 100 mmol/L As 混匀备用。

2) 平板划线活化菌株。挑单菌落于 5 mL 加有相应抗性 LB 的液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12~16 h 使 OD₆₀₀ 为 0.5~0.7,4 000 r/min 离心

6 min 收集菌体,弃上清;加 5 mL 菌悬缓冲液重悬菌体,4 000 r/min 离心 6 min 收集菌体,弃上清,再次用 5 mL 菌悬缓冲液重悬菌体,室温静置 3~5 h。

3) 农杆菌注射。将不同农杆菌样品与 P19 以等体积混合,用 1 mL 医用注射器(取掉针头)吸取适量体积的混合菌液,注射烟草下表皮;1.5~2.0 d 后,于荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察蛋白定位情况。

1.5 组织化学染色

1) 200 mL GUS 染色工作液配制。将 100 mL 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)、4 mL 50 mmol/L 铁氰化钾母液、4 mL 50 mmol/L 亚铁氰化钾母液、4 mL 0.5 mol/L EDTA 母液(pH 8.0)、1 mL 100 mg/mL X-Gluc 溶液和 200 μ L Triton X-100 混合,用蒸馏水定容至 200 mL,最后称 0.2 g 十二烷基肌氨酸钠溶于上述溶液,即配成 200 mL GUS 染色工作液(-20 $^{\circ}$ C 避光保存)。

2) GUS 染色。将植物组织用清水洗净,用吸水纸吸干表面的水分;将植物组织放入离心管中,加入 GUS 染色工作液至完全浸没植物组织,37 $^{\circ}$ C 培养箱中温育、染色 3~6 h 或有蓝色出现,用 70% 乙醇洗涤 4 次,使用立体显微镜观察。

1.6 百脉根毛根转化体系构建与鉴定

1) 百脉根 MG20 种子表面消毒及萌发。用浓 H₂SO₄ 处理百脉根 MG20 种子 8~12 min;小心吸出 H₂SO₄,用无菌水重复漂洗种子 3~4 次;用 2% (有效氯) NaClO 溶液处理 10~15 min,弃废液,用无菌水漂洗种子 7~10 次,最后留部分水浸没种子;4 $^{\circ}$ C 暗处理 1 d 左右使种子充分吸胀,置于 1/2 MS 无蔗糖固体培养基上;23 $^{\circ}$ C 暗培养 2~3 d,然后置于 23 $^{\circ}$ C 光照培养箱(16 h 光照,8 h 黑暗)中继续培养 1~2 d,待用。

2) 农杆菌侵染与阳性毛根鉴定。用剪刀将百脉根幼苗从下胚轴绿色的茎和白色的根之间膨大的位置倾斜剪下,用转入目标质粒的发根农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 菌液侵染剪好的幼苗 30 min。随后,幼苗在 HRE 培养基上生根 10~14 d。在体视荧光显微镜下,调好荧光通道,通过荧光筛选标记,鉴定阳性幼苗。

3) 炼苗、移栽和根瘤菌的接种。把鉴定的阳性苗放在装有水的平皿中,于 23 $^{\circ}$ C 光照培养箱炼苗 1~2 d。随后将幼苗移栽到蛭石和珍珠岩比例为 2:1 的花盆中,浇无氮营养液,放置于光照培养室中

生长。待幼苗移栽约 3~5 d 后,植株刚长出真叶(第 1 片叶子)时,接种根瘤菌 *M. loti* MAFF303099,2~3 周后,观察并统计共生表型。

2 结果与分析

2.1 百脉根 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因和蛋白结构特征

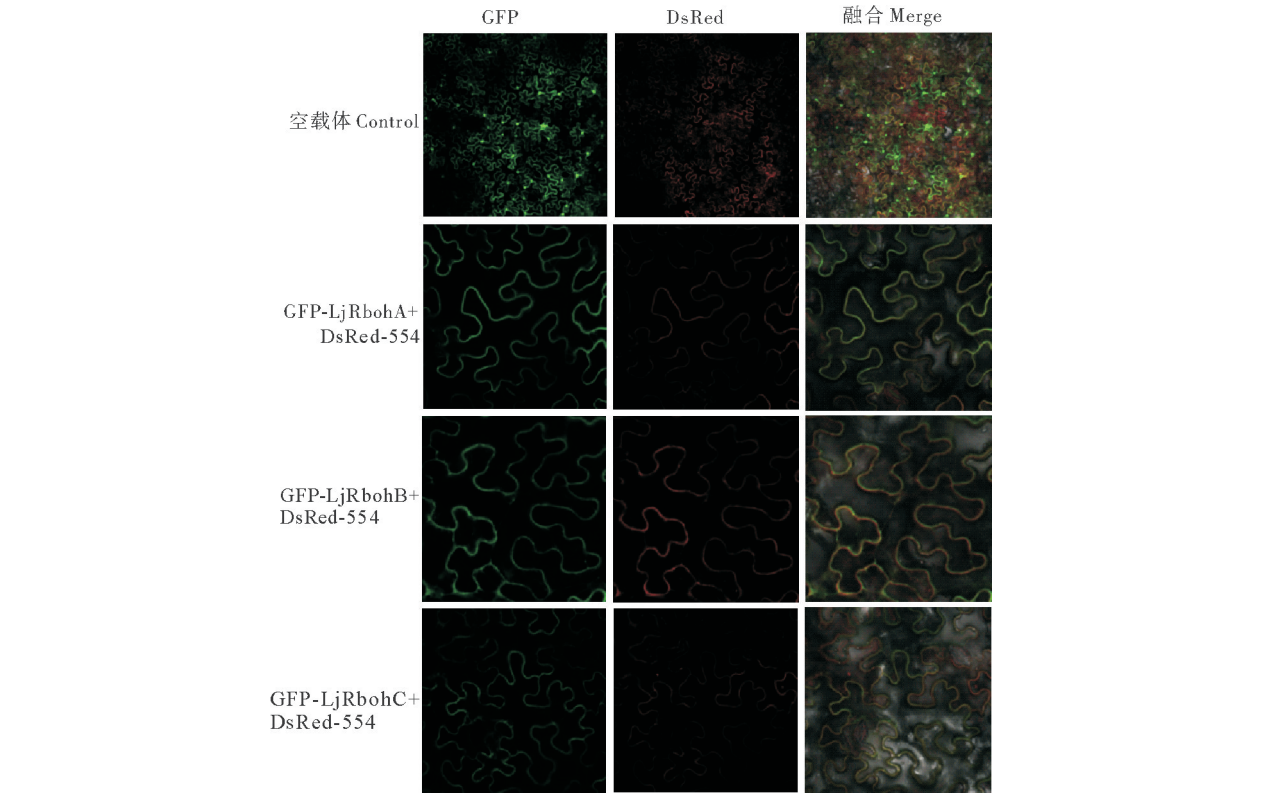
在百脉根中,*LjRbohA* 和 *LjRbohC* 基因位置相邻,都位于百脉根第 5 号染色体上。*LjRbohA* 的 CDS 全长由 2 388 个核苷酸组成,编码含 795 个氨基酸的蛋白;*LjRbohC* 的 CDS 全长由 2 679 个核苷酸组成,编码含 892 个氨基酸的蛋白;*LjRbohB* 位于百脉根第 6 号染色体上,CDS 全长由 2 661 个核苷酸组成,编码含 886 个氨基酸的蛋白。

LjRbohA、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 属于 NADPH 家族的蛋白,根据这 3 个蛋白的氨基酸序列,利用网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析其蛋白

结构,结果表明这 3 个蛋白都包含有保守的跨膜域,并且 *Rboh* 蛋白 N 端都包含约 300 个氨基酸延长区域,该区域包含 2 个保守的 Ca^{2+} 结合 EF 手性模体结构。

2.2 烟草叶片中 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 亚细胞定位

通过软件预测 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 蛋白都包含跨膜结构域,推测这 3 个蛋白可能定位在植物的细胞膜上。通过构建融合载体,使 GFP 分别融合在 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 的 N 端,该融合载体用 35S 启动子来启动表达,利用农杆菌 *A. tumefaciens* EHA105 介导烟草叶片瞬时表达蛋白,于激光共聚焦显微镜下观察蛋白定位情况。结果表明,35S 启动子启动表达的 GFP 在细胞核、细胞质及细胞膜上都有表达,而 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 融合的 GFP 蛋白在细胞膜上表达,故可以确定这 3 个蛋白都定位在植物的细胞膜上(图 1)。



LjRbohA、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 蛋白在烟草叶片中亚细胞定位,空载体 35S 启动子表达的 GFP 蛋白在细胞膜、细胞质和细胞核上表达(上),而 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 融合的 GFP 蛋白在细胞膜上表达(中和下),554 基因融合 DsRed 标签作为细胞膜标志物。Subcellular localizations of GFP-*LjRbohA*, GFP-*LjRbohB* and GFP-*LjRbohC* fusion proteins in *N. benthamiana* leaf cells. Nuclear, cell membrane and cytoplasm localizations of free GFP expressed from the control vector (Upper). GFP-*LjRbohA*, GFP-*LjRbohB* and GFP-*LjRbohC* were localized at the plasma membrane (Middle and bottom). 554 fused with DsRed was used as a plasma membrane marker.

图 1 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 蛋白烟草亚细胞定位

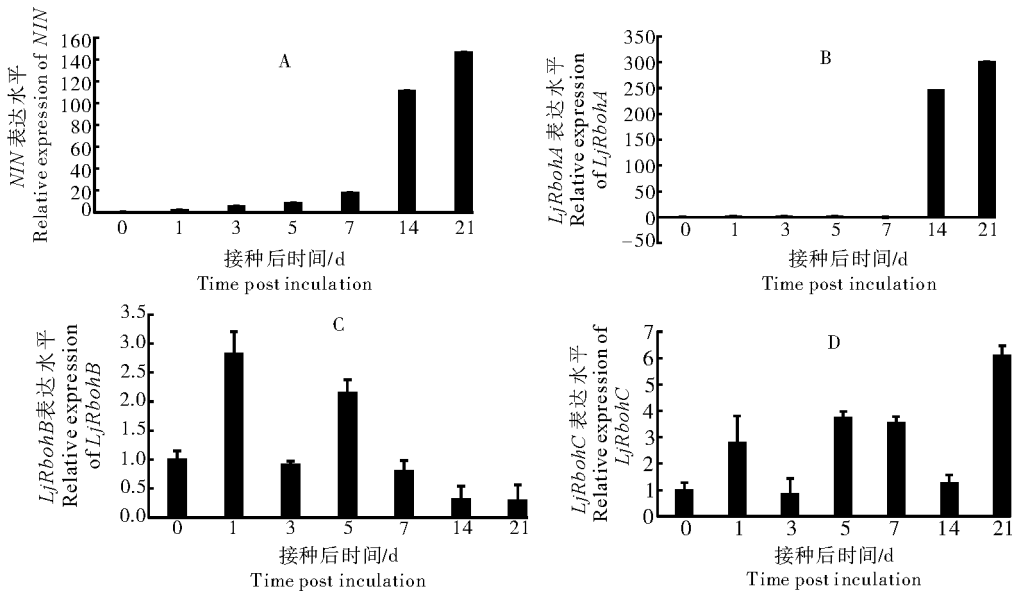
Fig.1 Subcellular localizations of *LjRbohA*, *LjRbohB* and *LjRbohC* in *N. benthamiana*

2.3 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因的表达分析

在基因表达谱信息分析数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)对比分析百脉根中各 *Rboh* 基因的表达图谱,发现在百脉根 *Rboh* 基因家族中 *LjRbohA* 是在百脉根根瘤中特异表达的基因;*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 是在百脉根根瘤中高表达的基因。

对此进行实验验证,分别在百脉根 MG20 接种根瘤菌 *M. loti* MAFF303099 后 0、1、3、5、7、14 d 和 21 d 对其根部组织抽提 RNA,设计引物通过 qRT-

PCR 检测这 3 个基因在接种根瘤菌前后各时期的表达情况。结果表明:同阳性对照 *NIN* 基因一样,百脉根根瘤中特异表达的基因 *LjRbohA* 在接种根瘤菌后 14 d 和 21 d 上调表达非常显著(图 2 A、B),而该阶段正是根瘤形成时期。*LjRbohB* 在接种根瘤菌 1 d 后有短暂上调表达,之后则表达下调(图 2C)。*LjRbohC* 在接种根瘤菌 21 d 表达上调 5 倍(图 2D)。综上,*LjRbohA* 在百脉根根瘤中表达显著,很有可能参与了共生结瘤过程。同时 *LjRbohB* 和 *LjRbohC* 在接种根瘤菌后表达上调,也有可能参与了共生结瘤过程。



以 *Ubiquitin* 作为内参基因,通过 qRT-PCR 检测接种根瘤菌后 0、1、3、5、7、14 d 和 21 d *LjRboh* 基因的表达水平,以 0 d 未接种的根部样品作为空白对照,*NIN* 基因作为阳性对照。数据是 3 次技术重复的平均值。* * 表示经 Student's *t* test 检验,实验组与对照组相比,具有显著性差异($P < 0.01$)。A: *NIN* 基因的表达模式; B: *LjRbohA* 基因的表达模式; C: *LjRbohB* 基因的表达模式; D: *LjRbohC* 基因的表达模式。The relative expression of each *LjRboh* gene was evaluated by qRT-PCR in roots of plants harvested at 0 d, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d and 21 d post inoculation (dpi). Transcript accumulation was normalized to the expression of *Ubiquitin*, which was used as a reference gene. Uninoculated roots (0 d) served as a control. *NIN* gene as a positive control. Error bars represent means $\pm$ SD. Data are the averages of three technical replicates. Asterisk * * represents significant differences compared with control plants (Student's *t* test) ($P < 0.01$). A: Expression profiles of *NIN*; B: Expression profiles of *LjRbohA*; C: Expression profiles of *LjRbohB*; D: Expression profiles of *LjRbohC*.

图 2 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因的表达模式

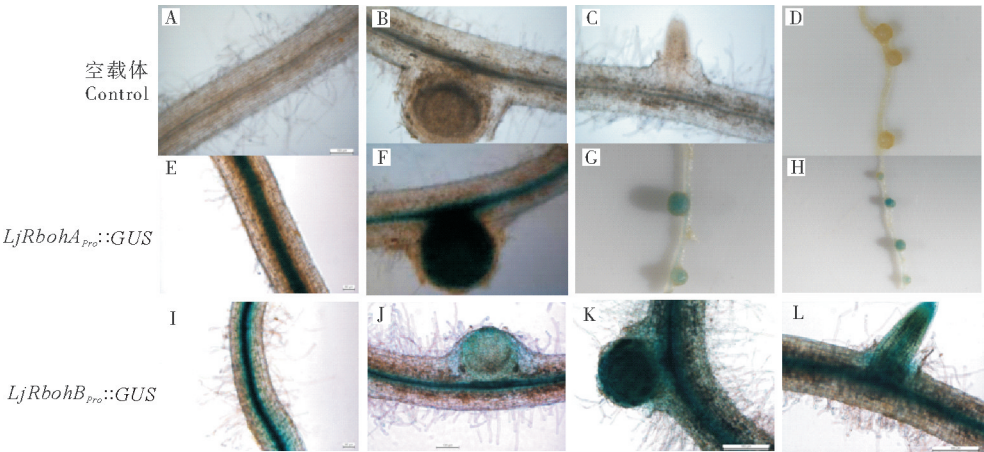
Fig.2 Expression profiles of *LjRbohA*, *LjRbohB* and *LjRbohC*

2.4 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因的启动子活性分析

为了进一步研究 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因的时空表达特征,将这 3 个基因的起始密码子 ATG 上游 2 kb 启动子(启动子序列来源于网站 <http://www.kazusa.or.jp/lotus/>)构建到载体 DX2181-mcherry 上,构建这 3 个基因启动子与 *GUS* 报告基因的融合载体。其中 *LjRbohC*_{P_{ro}} ::

GUS 融合载体构建失败,原因可能是网站上提供 *LjRbohC* 启动子序列存在问题。以百脉根 MG20 基因组为模板 PCR 扩增 *LjRbohC* 启动子序列,扩增的启动子序列测序结果与网站上提供的序列不匹配。将 *LjRbohA*_{P_{ro}} :: *GUS* 和 *LjRbohB*_{P_{ro}} :: *GUS* 融合载体转化到农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 中,空载体 DX2181-mcherry 作为对照,利用毛根转化体系,在百脉根的根和根瘤中检测 *GUS* 活性。

在接种根瘤菌 7~14 d 时检测启动子表达活性,结果表明,对照组在任何组织都不表达,*LjRobhA* 和 *LjRobhB* 基因在根瘤,维管束和侧根原基表达(图 3)。



通过组织化学染色检测转基因植株中启动子活性,在转入空载体的转基因植株中没有检测到 GUS 活性(A-D); A:维管束; B和D: 14 d 根瘤; C:侧根原基; *LjRobhA_{pro} :: GUS* 转基因植株在维管束(E)及根瘤组织(F-H)检测到 GUS 蛋白表达; *LjRobhB_{pro} :: GUS* 转基因植株在维管束(I)、根瘤组织(J,K)及侧根原基(L)检测到 GUS 蛋白表达。Promoter activity was revealed by histochemical staining of transgenic roots. A to D no GUS activity was detected in nodules and in transgenic roots bearing a promoter-less construct as a control. A: Vascular tissue; B and D :Nodule (14 dpi); C:Lateral root primordia. *LjRobhA_{pro} :: GUS* activity in transgenic roots was detected at the vascular tissue (E) and the nodule (F to H). *LjRobhB_{pro} :: GUS* activity in transgenic roots was detected at the vascular tissue (I),the nodule (J and K),and in the cells at the base of lateral root primordia (L).

图 3 组织化学染色分析 *LjRobhA* 和 *LjRobhB* 基因的表达

Fig.3 Expression analysis of *LjRobhA* and *LjRobhB* by histochemical staining

2.5 CRISPR-Cas9 系统敲除 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 毛根转化载体的构建

1) *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 单基因敲除毛根转化载体的构建。首先,构建 LjU6 启动 sgRNA 的表达单元,将 tRNA-gRNA 连接到中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6 上(图 4A,B)。然后通过酶切酶连将 LjU6-tRNA-sgRNA 连接到最终载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9 上,即构建了包含 4 个 sgRNA 的百脉根毛根转化 *LjRbohB* 单基因敲除载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA (*LjRbohB*)(图 4D)。

2) *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 2 个基因及 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 3 个基因同时敲除毛根转化载体的构建。由于 *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 位于同一染色体上且基因位置相邻,可能存在基因冗余的情况,所以将 2 个基因进行同时敲除。将 LjU6-tRNA-sgRNA (*LjRbohA*) 和 LjU6-tRNA-sgRNA (*LjRbohC*)串联在一起,实现 2 个基因的同时敲除,选 pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA (*LjRbohC*)作为中间载体,通过酶切酶连将 LjU6-tRNA-sgRNA (*LjRbohA*)连接到该中间载体上(图 4 A,B)。最后

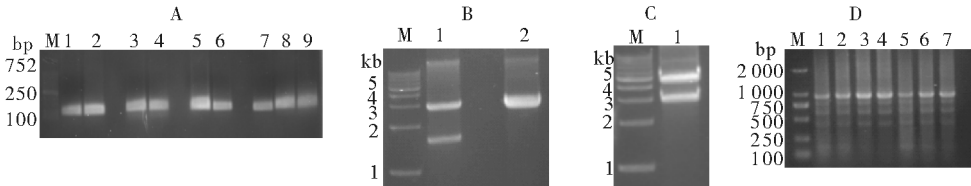
再连接到最终载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9 上,即构建好对 2 个基因进行同时敲除的载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA (*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)(图 4D)。同理,选 pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)作为载体,通过酶切酶连将 LjU6-tRNA-sgRNA (*LjRbohB*)连接到该中间载体上(图 4 A,C)。最后连接到最终载体上,即构建好对 3 个基因进行同时敲除毛根转化载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA (*LjRbohC*)-LjU6-gRNA (*LjRbohA*)-LjU6-gRNA(*LjRbohB*)(图 4 D)。

2.6 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 3 个基因同时敲除毛根转化表型分析

为了研究 *LjRboh* 基因家族是否影响百脉根的共生结瘤过程,采用百脉根毛根转化体系来对植株结瘤表型进行分析。将作为对照的空载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9 和构建好的对 3 个基因进行同时敲除的毛根转化载体 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)-LjU6-gRNA (*LjRbohB*) 转入发根农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 中,得到阳性转基因幼苗。

将转基因幼苗移栽到蛭石和珍珠岩中,接种根瘤菌 *M. loti* MAFF303099,于光照培养室中生长,每隔 3 d 浇 1 次无氮营养液,在接种根瘤菌 21 d 后观察统计转基因植株的结瘤情况。结果发现,与对照植株相比,同时对 *LjRboh* 基因家族的 3 个基因 *LjR-*

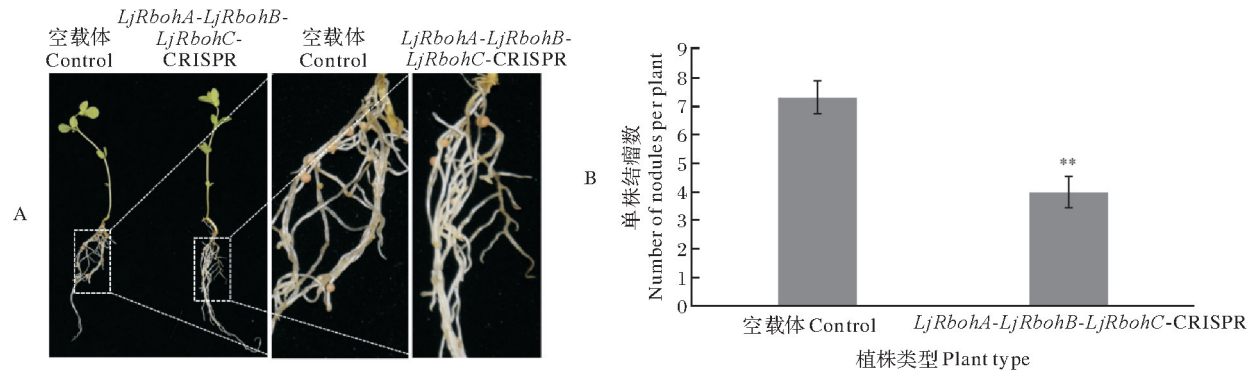
bohA、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 进行敲除时,转基因植株结瘤数目减少。这说明 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因可能参与调控了百脉根的共生结瘤过程,并且在该过程中发挥着正调控的作用(图 5)。



A:PCR 扩增片段;泳道 1~3、4~6 和 7~9 分别是 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 的 tRNA-sgRNA 结构单元; B:泳道 1 和 2 为酶切(*Kpn* I / *Xba* I)鉴定中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA (*LjRbohB*)和 pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)的成功构建; C:酶切(*Kpn* I / *Xba* I)鉴定中间载体 pBluescript SK(+)-LjU6 gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)-LjU6-gRNA(*LjRbohB*)成功构建(泳道 1); D: PCR 分别鉴定最终载体 pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA(*LjRbohB*) (泳道 1~2)、pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*) (泳道 3~4)和 pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)-LjU6-gRNA(*LjRbohB*) (泳道 5~7)的成功构建。A:PCR amplification products. Lane 1-3, Lane 4-6 and Lane 7-9: The tRNA-sgRNA unit of *LjRbohA*, *LjRbohB* and *LjRbohC* respectively. B: Middle vectors pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA (*LjRbohB*) (Lane 1) and pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*) (Lane 2) were correctly constructed, identified with double-enzyme(*Kpn* I / *Xba* I) respectively. C: Middle vector pBluescript SK(+)-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)-LjU6-gRNA(*LjRbohB*) was correctly constructed, identified with double-enzyme (*Kpn* I / *Xba* I) (Lane 1); D: Recombinant expression vectors pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA (*LjRbohB*) (Lane 1-2), pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA (*LjRbohC*)-LjU6-gRNA (*LjRbohA*) (Lane 3-4) and pCambia1300-sGFP-Cas9-LjU6-gRNA(*LjRbohC*)-LjU6-gRNA(*LjRbohA*)-LjU6-gRNA(*LjRbohB*) (Lane 5-7) were correctly constructed, identified with PCR respectively.

图 4 CRISPR-Cas9 系统毛根转化载体的构建

Fig.4 Construction of CRISPR-Cas9 hair root transformation vectors



A:空载体转基因植株和 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 3 个基因同时敲除的转基因植株结瘤表型; B:接种根瘤菌后 21 d 植株结瘤数目统计。* * 表示经 Student's *t*-test 检验,实验组与对照组相比,具有显著性差异($P<0.01$)。误差线代表 $\pm$ SEM,数据是 3 次生物学重复的平均值($n>20$)。A: Nodulation phenotypes of control transgenic roots and *LjRbohA-LjRbohB-LjRbohC* knockout transgenic roots. B: Nodule number in transformed hairy roots at 21 d after inoculation with *M. loti* MAFF303099. Asterisk (**) represents significant differences compared with control plants (Student's *t* test) ($P<0.01$). Error bars represent means $\pm$ SD. Data are the averages of three biological replicates ($n>20$).

图 5 CRISPR/Cas9 系统介导的 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因编辑对植株结瘤的影响

Fig.5 Effect of CRISPR/Cas9 mediated gene editing of *LjRbohA*, *LjRbohB* and *LjRbohC* on plant nodulation

2.7 *LjRbohB* 单基因敲除和 *LjRbohA*、*LjRbohC* 双基因敲除的毛根转化表型分析

当对 *LjRboh* 基因家族的 3 个基因 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 进行同时敲除时,转基因植株结瘤数目减少,说明 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 基因可能参与了百脉根的共生结瘤过程。为了进一步研究这 3 个基因各自对百脉根结瘤过程的影响,分别对这 3 个基因进行了单基因敲除和双基因敲除。由于 *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 位于同一染色

体上且基因位置相邻,可能存在基因冗余的情况,所以将 2 个基因进行双敲除观察共生表型,并同时对于 *LjRbohB* 基因进行单敲除以观察共生表型。

结果发现,对 *LjRbohB* 进行单基因敲除时结瘤数目减少。同时,对 *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 进行双基因同时敲除时结瘤数目也比对照组减少。这表明 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 3 个基因可能都参与了百脉根的共生结瘤过程(图 6)。

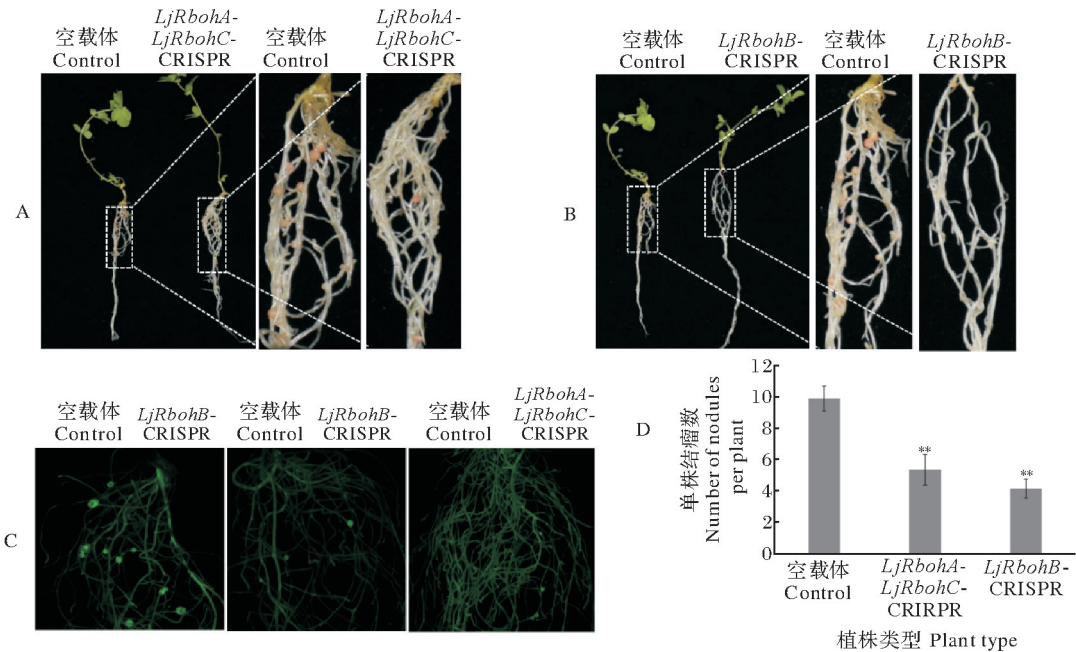


图 6 转基因植株 *LjRbohB*-CRISPR、*LjRbohA*-*LjRbohC*-CRISPR 的共生表型
Fig.6 Symbiosis phenotypes of transgenic *LjRbohB*-CRISPR, *LjRbohA*-*LjRbohC*-CRISPR plants

3 讨论

本研究结果表明百脉根 *LjRboh* 基因家族中的 3 个基因 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 都在根瘤内表达,其中 *LjRbohA* 在百脉根结瘤时期表达上调同 *NIN* 基因一样显著,而 *LjRbohB* 在接种根瘤菌 1 d 后有短暂上调表达,*LjRbohC* 在接种根瘤菌后 21 d 表达也上调了 5 倍。对这 3 个基因进行分

别敲除时,转基因植株结瘤数目减少,表明 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 这 3 个基因可能都参与了百脉根的共生结瘤过程。

Marino 等^[19]在蒺藜苜蓿中报道了 *MtRbohA* 在接种根瘤菌后表达水平显著上调,且 *MtRbohA* 影响了共生结瘤过程。在豆科植物菜豆中发现对 *PvRbohB* 进行 RNAi 时,会导致侵染线形成受阻,并进一步抑制了根瘤的形成^[20-21]。但是在百脉根中

还没有关于 *Rboh* 调控共生结瘤的相关研究。通过分析豆科植物蒺藜苜蓿、百脉根、大豆及菜豆 *Rboh* 家族系统进化树发现,百脉根中 *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 与蒺藜苜蓿 *MtRbohA* 同源性较高,且 *LjRbohA* 和 *LjRbohC* 基因位置相邻,都位于百脉根第 5 号染色体上。而百脉根 *LjRbohB* 与菜豆 *PvRbohB* 同源性较高。在豆科植物中 *Rbohs* 是一个多基因家族,是否还有其他的 *Rboh* 基因参与共生结瘤过程值得进一步研究。

在豆科植物与根瘤菌的共生过程中,*Rboh* 是介导 ROS 产生的主要来源。研究表明,ROS 作为重要的信号分子调控了侵染线及根瘤的形成过程。另外有研究报道,通过沉默苜蓿中 ROP9-GTPase 基因导致侵染线形成受到抑制^[22]。豆科植物识别结瘤因子后,豆科植物毛根根尖钙离子浓度富集,同时 *Rboh* 介导 ROS 产生。小 G 蛋白可以和 *Rboh* 蛋白上的 2 个 EF-hand 结构域发生相互作用,小 G 蛋白 ROP 可能通过磷酸化 *Rboh* 的 N 末端来调控 *Rboh* 氧化酶的活性,进而调控 ROS 的产生,ROS 则作为重要的信号分子调控根瘤菌的侵染和根瘤器官的形成^[23]。在百脉根中有 10 个同源性相近的小 G 蛋白,其与 *LjRbohA*、*LjRbohB* 和 *LjRbohC* 之间的相互作用值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] FLOWLER D, COYLE M, SKIBA U, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368: 20130164.
- [2] 李豪, 梅江鹏, 张忠明. 豆科共生关键基因表达载体的构建及其功能互补分析[J]. *中国科技论文*, 2016, 11(24): 2806-2810.
- [3] 李文清, 曹文刚, 李豪, 等. 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[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(4): 55-61.
- [4] OLDROYD G E. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 252-263.
- [5] MADSEN L H, TIRICHINE L, JURKIEWICZ A, et al. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus* [J]. *Nat Commun*, 2010, 1: 10. DOI: 10.1038/ncomms1009.
- [6] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373-399.
- [7] TORRES M A, DANGL J L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 397-403.
- [8] TORRES M A, DANGL J L, JONES J D. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 99: 517-522.
- [9] YOSHIOKA H, NUMATA N, NAKAJIMA K, et al. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* [J]. *Plant cell*, 2003, 15: 706-718.
- [10] TAKEDA S, GAPPER C, KAYA H, et al. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells [J]. *Science*, 2008, 319: 1241-1244.
- [11] PUPPO A, PAULY N, BOSCARI A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume-rhizobium and mycorrhizal symbioses [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 2202-2219.
- [12] DAMIANI I, PAULY N, PUPPO A, et al. Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume-rhizobium symbiotic interaction [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 454.
- [13] FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL J H, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Nature*, 2003, 422: 442-446.
- [14] SUZUKI N, MILLER G, MORALES J, et al. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 691-699.
- [15] MARINO D, DUNAND C, PUPPO A, et al. A burst of plant NADPH oxidases [J]. *Trends in plant science*, 2012, 17: 9-15.
- [16] WANG L X, WANG L L, TAN Q, et al. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9 [J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1333-1346.
- [17] 谭茜, 王龙祥, 张先鹏, 等. CRISPR/Cas9 在豆科植物毛根转化中的应用及共生基因的编辑 [J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(5): 45-51.
- [18] LEI Y, LU L, LIU H Y, et al. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plant [J]. *Molecular plant*, 2014, 7: 1494-1496.
- [19] MARINO D, ANDRIO E, DANCHIN E G, et al. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning [J]. *New Phytol*, 2011, 189: 580-592.
- [20] MONTIEL J, NAVA N, CARDENAS L, et al. A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by Rhizobia [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 1751-1767.
- [21] ARTHIKALA M K, SANCHEZ-LOPE R, NAVA N, et al. *RbohB*, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization [J]. *New Phytol*, 2014, 202: 886-900.
- [22] KIIRIKA L M, BERGMANN H F, SCHIKOWSKY C, et al. Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection [J]. *Plant Physiol*,

2012,159;501-516.

[23] MONTIEL J,ARTHIKALA M K,CARDENAS L,et al. Leg-ume NADPH oxidases have crucial roles at different stages of nodulation[J]. Int J Mol Sci,2016,17:680.

Function of *Rboh* gene family in *Lotus japonicas*
during symbiotic nitrogen fixation

LING Ying ZHANG Tingting DUANMU Deqiang ZHANG Zhongming CAO Yangrong
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Sciences and Technology,
Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

Abstract Three *Rboh* (reactive oxygen species) genes including *RbohA* (Lj5g3v1497840), *RbohB* (Lj6g3v1549190) and *RbohC* (Lj5g3v1497820) were found to be primarily expressed in nodules based on the transcriptions of *Rboh* genes in symbiosis in *Lotus japonicus*. Their function involved in symbiosis were further studied in *Lotus japonicus*.The subcellular location of proteins,the expression pattern of *Rboh* genes,the proteins function and the promoter activity of *Rboh* genes in *Lotus japonicas* were studied with methods of molecular biology,cell biology and genetics. The results showed that LjRbohA,LjRbohB and LjRbohC proteins were localized at the plasma membrane.The transcript of *LjRbohA*,*LjRbohB* and *LjRbohC* accumulated abundantly in roots and nodules. The activity of *LjRbohA* and *LjRbohB* promoters were detected at vascular tissue,nodule,and the lateral root primordia.The numbers of nodules were reduced in *LjRbohB*,*LjRbohA-LjRbohC* and *LjRbohA-LjRbohB-LjRbohC* knockout transgenic roots compared with control transgenic roots. It is indicated that these three *Rboh*s might have an overlapping function in regulating nitrogen fixation symbiosis in *L. japonicus*.

Keywords *Lotus japonicus*; symbiotic nitrogen fixation; respiratory burst oxidase homologue (*Rboh*); reactive oxygen species(ROS); nodule

(责任编辑:张志钰)