

# 百脉根起始结瘤相关转录因子间相互作用的鉴定

樊玉倩 肖爱芳 张忠明

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** 以模式豆科植物百脉根为材料, 利用酵母双杂交和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术, 研究调控起始结瘤基因表达的转录因子 IPN2、NSP2、CYCLOPS、DELLA 间的相互作用。结果显示, 百脉根 IPN2 与 DELLA、NSP2 与 DELLA、CYCLOPS 与 DELLA 均有相互作用。表明 IPN2、DELLA 可能参与并形成一个大蛋白复合物, 网络调控豆科植物起始结瘤基因的时空表达。

**关键词** 百脉根; 转录因子; 起始结瘤基因; 酵母双杂交; 双分子荧光互补

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0010-06

豆科植物与根瘤菌之间共生关系的建立是一个复杂的相互作用过程<sup>[1-3]</sup>, 豆科植物响应来自根瘤菌及周围环境的信号进而促进细菌的侵染和起始结瘤, 在这个过程中转录因子扮演着重要角色。在豆科植物中起始结瘤 NIN(nodule inception)转录因子位于共生信号途径末端, 是控制结瘤的关键元件<sup>[4-5]</sup>。然而, NIN 基因的表达受到多个转录因子的调控; 如: NSP1/NSP2 (nodulation signaling pathway)、CYCLOPS、IPN2、DELLA 等, 其中 NSP1、IPN2、CYCLOPS 可直接与 NIN 启动子结合, NSP2、DELLA 则与它们互作而形成复合物调控 NIN 的表达<sup>[6-7]</sup>。已有的研究表明, 在豆科植物共生信号途径中, 钙和钙调素依赖性蛋白激酶(CCaMK)是一个核心元件, 具有解码钙离子信号的功能<sup>[8]</sup>。转录因子 CYCLOPS 与 CCaMK 形成复合物并被磷酸化后调节 NIN 的表达。GRAS 家族类转录因子 NSP1 和 NSP2 受结瘤因子诱导表达并形成复合物, 为起始结瘤基因表达所必需<sup>[9]</sup>。有趣的是, CYCLOPS 激活 NIN 的表达不需要 NSP1-NSP2 复合物, 但是 CYCLOPS 诱导根瘤发育则需要 NSPs<sup>[10]</sup>。因此, NSP1-NSP2 的调节功能是与 CCaMK-CYCLOPS 的作用有关, 或两种蛋白复合物在根瘤共生中独立发挥作用还有待研究。最近在苜蓿中研究发现, 作为赤霉素(GA)信号途径中的一个转录抑制子, DELLA 分别能与 NSP1/NSP2 和

CCaMK/IPD3(IPD3 是 CYCLOPS 同源物)形成复合物, 具有调节根瘤和丛枝菌根形成的功能<sup>[7]</sup>。

笔者所在研究室于百脉根中分离到的 IPN2 则属于 MYB 类转录因子, 在共生过程中能与 NSP1/NSP2 形成复合物并具有结合 NIN 启动子的功能<sup>[11-12]</sup>。然而, 在百脉根中, NSP2 分别与 IPN2 和 NSP1 相互作用, IPN2 和 NSP1 都能直接作用于 NIN 启动子, 但其多个转录因子协同调控机制还不清楚。本研究以百脉根为材料, 利用酵母双杂交和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术, 初步探讨上述几个转录因子间的蛋白互作关系, 旨在为进一步揭示 NIN 基因复杂的转录调控机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH109、Y187 菌株, 质粒 pGBKT7、pGA-DT7、pGADT7-SV40、pGBKT7-53、pGBKT7-Lam 购自 Clontech 公司。pCAMBIA1301 植物表达载体来源于 CambiaLabs 公司, *E. coli* DH10B 菌株购于 Invitrogen 公司。烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105 菌株来自华中农业大学农业微生物学国家重点实验室。

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670240)

樊玉倩, 硕士研究生, 研究方向: 固氮微生物学. E-mail: 1689363429@qq.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,质粒提取、胶回收试剂盒等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司,PCR 所用引物由上海生工生物工程有限公司提供,测序由北京奥科生物公司完成。

1.3 酵母双杂交技术检测蛋白间的相互作用

利用 PEG/LiAc 转化法,将构建于 pGADT7 靶载体上的质粒转化酵母 AH109 菌株,构建于 pGBKT7 诱饵载体的质粒转化酵母 Y187 菌株,并分别涂布 SD/-Leu 和 SD/-Trp 营养缺陷型培养基。将验证正确的诱饵质粒和靶质粒按不同的组合挑取菌落于 1 mL 2 × YPDA 液体培养基,100 r/min、30 ℃ 培养 20~24 h 进行有性杂交,之后将培养物涂布 SD/-Leu-Trp 二缺培养基和 SD/-Leu-Trp-His-Ade 四缺培养基,根据酵母菌株在二缺和四缺培养基上的生长情况来判断 2 个蛋白之间是否存在相互作用。

1.4 BiFC 技术检测蛋白间的相互作用

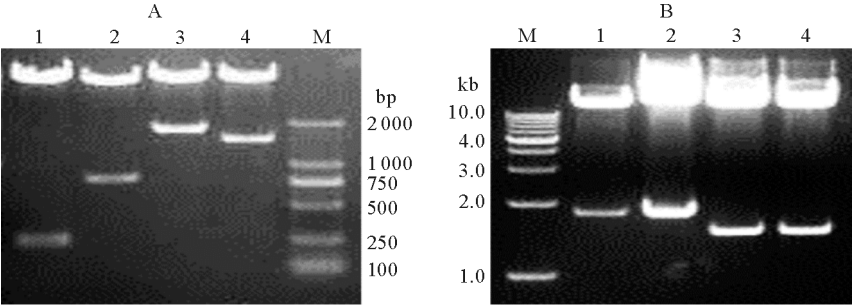
将目的基因构建到 pCAMBIA1301 载体上,分别与黄色荧光蛋白 YFP 的 N-端或 C-端形成融合蛋白,得到 BiFC 载体。验证正确的质粒电转化导入农杆菌 EHA105,鉴定并于-80 ℃ 保存。根据需要按不同的组合共注射烟草叶片,通过观察有否黄色荧光产生来判断 2 个蛋白间是否存在相互作用<sup>[13]</sup>。具体方法如下:注射前 3~4 d 挑取保存的菌株划线于含有相应抗生素的平板上,28 ℃ 培养。挑取单菌

落于 5 mL LB 加相应抗生素的液体培养基中,28 ℃ 培养 16~24 h。按 0.5% 的量将过夜培养物转接于 LB-MES(10 mmol/L,pH 6.0)液体培养基中,并加入相应抗性抗生素和 As(乙酰丁香酮),28 ℃ 培养 12~16 h。离心,去上清,用缓冲液悬浮(10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L MES, 200 μmol/L As)调整 OD<sub>600</sub>,室温静置 2~3 h。将农杆菌等比例混合,选取 2~3 片叶片注射,2~3 d 后剪下注射叶片部位,制片,激光共聚焦扫描显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 百脉根 DELLA 基因克隆及相关蛋白互作载体的构建

在百脉根基因组上存在 3 个 *LjDELLA* 基因,分别被命名为 *LjDELLA1*、*LjDELLA2* 和 *LjDELLA3*<sup>[14]</sup>。笔者所在研究室在前期工作中已克隆 *LjDELLA2* 并构建到 pGADT7 质粒上。本研究克隆出 *LjDELLA1* 和 *LjDELLA3* 并分别构建 pGADT7-*LjDELLA1* 和 pGADT7-*LjDELLA3* 载体。由于百脉根 *LjIPN2* 在诱饵载体 pGBKT7 上,在酵母中具有自激活活性,故将 *IPN2* 蛋白截短为 *IPN2*(1~178 aa)和 *IPN2*(106~358 aa)2 段,分别构建成酵母表达载体 pGBKT7-*LjIPN2*<sup>1-178</sup> 和 pGBKT7-*LjIPN2*<sup>106-358</sup>。所构建的载体均经过酶切验证(图 1A)。同时,也分别将 *LjDELLA1*、*LjDELLA3* 构建到 pCAMBIA1301 载体上,分别



A.酵母表达载体的酶切验证。泳道 1、3、4 分别是 pGBKT7-*LjIPN2*<sup>1-178</sup>、pGADT7-*LjDELLA1*、pGADT7-*LjDELLA3* 的 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切结果;泳道 2:pGBKT7-*LjIPN2*<sup>106-358</sup> 的 *NdeI* 和 *SalI* 双酶切结果;M:DL2000 DNA marker。B.BiFC 载体的酶切验证。泳道 1~4 分别是 pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA1*、pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA1*、pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA3*、pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA3* 的 *KpnI* 和 *SalI* 双酶切结果;M:1 kb DNA marker。A.Digestion of yeast expression plasmid. Lane 1, 3, 4: pGBKT7-*LjIPN2*<sup>1-178</sup>, pGADT7-*LjDELLA1*, pGADT7-*LjDELLA3* digested with *EcoRI* and *SalI*; Lane 2: pGBKT7-*LjIPN2*<sup>106-358</sup> digested with *NdeI* and *SalI*; M:DL2000 DNA marker. B. Digestion of BiFC plasmid. Lane 1-4:pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA1*, pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA1*, pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA3*, pCAMBIA1301-eYFP-*LjDELLA3* digested with *KpnI* and *SalI*; M:1 kb DNA marker.

图 1 酵母表达载体和 BiFC 载体的验证

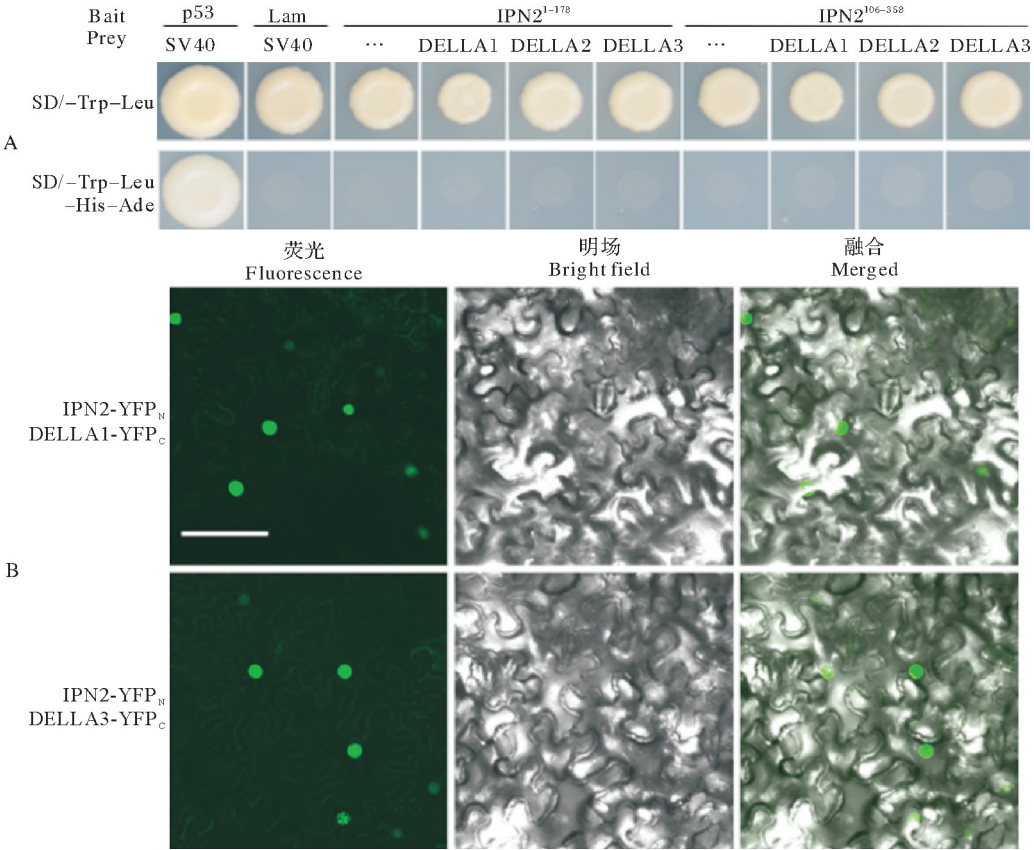
Fig.1 Identification of plasmid in yeast expression and BiFC system

与 N-端 eYFP<sub>N</sub> 和 C-端 eYFP<sub>C</sub> 形成融合蛋白,得到 4 个 BiFC 载体,即: pCAMBIA1301-eYFP<sub>N</sub>-DEL-  
LA1、pCAMBIA1301-eYFP<sub>C</sub>-DELLA1、pCAM-  
BIA1301 -eYFP<sub>N</sub>-LjDELLA3 和 pCAMBIA1301-  
eYFP<sub>C</sub>-LjDELLA3,并通过酶切(图 1B)和测序进  
行验证。

2.2 百脉根 IPN2 和 DELLAs 的相互作用

为了确定百脉根中 IPN2 是否与 DELLAs 相互  
作用,分别将含有 IPN2<sup>1-178</sup> 和 IPN2<sup>106-358</sup> 的 pGBKT7  
载体导入酵母菌株 Y187;分别将含有 DELLA1、  
DELLA2、DELLA3 的 pGADT7 载体导入酵母菌株

AH109,经两菌株有性杂交后,在选择性培养基上  
观察菌落生长。结果显示,含 IPN2<sup>1-178</sup> 和 IPN2<sup>106-358</sup>  
菌株与含有 DELLA1、DELLA2、DELLA3 菌株杂  
交后,在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 的平板上都  
不能生长,说明 IPN2 的 N-端或 C-端都不能与  
DELLAs 相互作用(图 2A)。利用 BiFC 系统,选取  
DELLA1、DELLA3 分别与 IPN2 共注射烟草叶片,  
在烟草表皮叶肉细胞核中均可观察到较强荧光(图  
2B),说明全长的 IPN2 能与 DELLAs 相互作用。  
在酵母双杂交和 BiFC 中出现不同结果,一方面可  
能在酵母中表达的蛋白缺乏正确构象或需要其他植



A.在酵母中检测 DELLAs 与 IPN2<sup>1-178</sup> 及 IPN2<sup>106-358</sup> 间的相互作用。将含有 DELLA1、DELLA2、DELLA3 靶质粒的菌株分别和含有 IPN2<sup>1-178</sup>、IPN2<sup>106-358</sup> 诱饵质粒的菌株通过有性交配得到二倍体酵母并涂布于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 的培养基上生长。p53/SV40 和 Lam/SV40 组合分别作为阳性对照和阴性对照。B.在烟草叶片表皮细胞中通过 BiFC 技术检测蛋白质间的相互作用。将 DELLA1-eYFP<sub>C</sub>、DELLA3-eYFP<sub>C</sub> 分别和 IPN2-eYFP<sub>N</sub> 共注射烟草叶片可以观察到 YFP 荧光。标尺为 100 μm。A. Interactions between DELLAs and IPN2<sup>1-178</sup> or IPN2<sup>106-358</sup> were detected in yeast. Among them,DELLA1 to 3 were fused to pGADT7 as target plasmid,and IPN2<sup>1-178</sup>, IPN2<sup>106-358</sup> were fused to pGBKT7 as bait plasmid. The bait plasmid in Y187 strain,the target plasmid in the AH109 strain,the diploid yeast obtained by sexually mating grew on media with SD/-Trp-Leu and SD/-Trp-Leu-His-Ade. The combination of p53/SV40 and Lam/SV40 were used as positive control and negative control. B.Detection of protein-protein interactions in *N. benthamiana* leaf epidermal cells by BiFC. YFP fluorescence of leaves co-transformed with DELLA1,DELLA3-eYFP<sub>C</sub>and IPN2-eYFP<sub>N</sub>. Scale bars=100 μm.

图 2 IPN2 和 DELLAs 的相互作用

Fig.2 Interactions between IPN2 and DELLAs

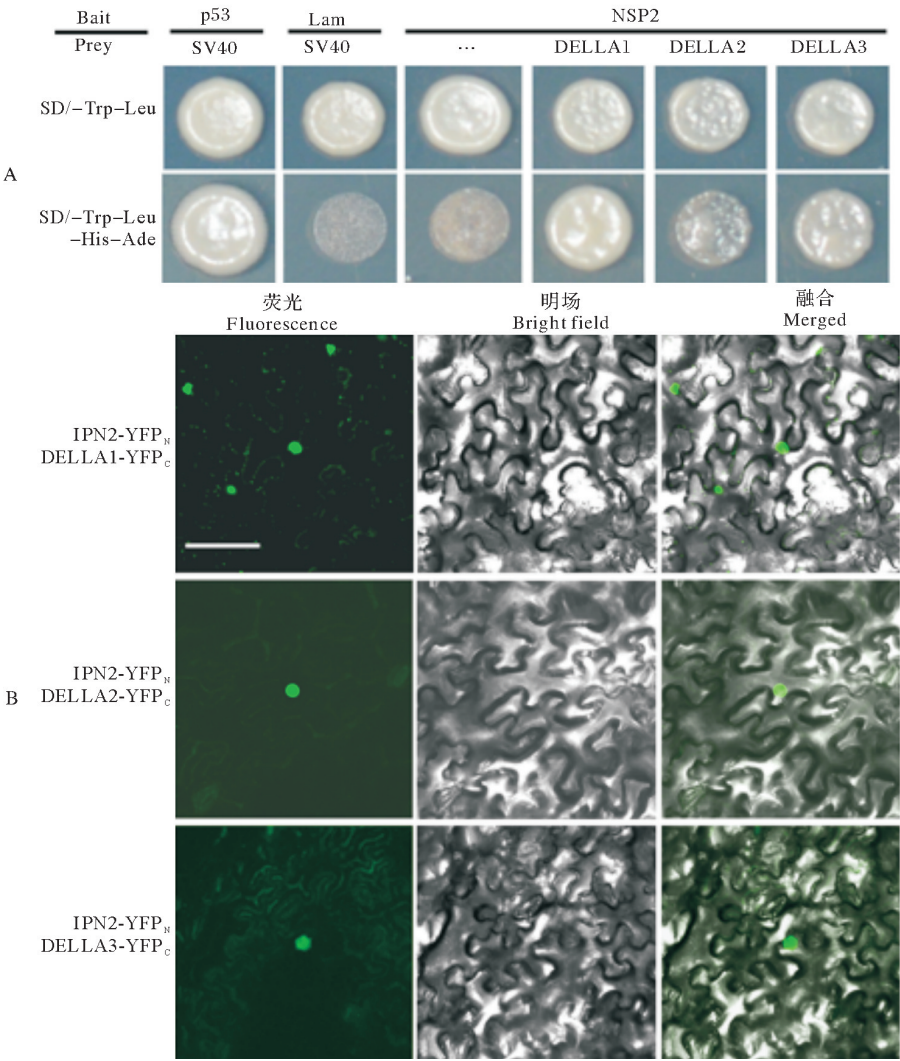


物蛋白的参与;另一方面 IPN2 和 DELLAs 的相互作用需要具有功能的全长蛋白。

2.3 百脉根 NSP2 和 DELLAs 的相互作用

在苜蓿中,DELLA 作为转录因子能够与 NSP2 互作并调控根瘤和丛枝菌根的形成<sup>[7]</sup>。为了验证豆科植物中是否都存在同样的作用机制,利用酵母双

杂交和 BiFC 技术,探讨百脉根中 DELLA 与 NSP2 间互作关系。结果显示,百脉根 NSP2 与 DELLAs 在酵母 GAL4 系统中都可以相互作用(图 3A)。BiFC 结果显示,DELLA1、DELLA2、DELLA3 分别与 NSP2 共转化烟草叶片后,都可以在烟草表皮叶肉细胞核中观察到荧光(图 3B),说明其相互作用



A.在酵母中检测 DELLAs 与 NSP2 间的相互作用。将含有 DELLA1、DELLA2、DELLA3 靶质粒的菌株分别与含有 NSP2 诱饵质粒的菌株通过有性交配得到二倍体酵母并涂布于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 的培养基上生长。p53/SV40 和 Lam/SV40 组合分别作为阳性对照和阴性对照。B.在烟草叶片表皮细胞中通过 BiFC 技术检测蛋白质间的相互作用。将 DELLA1-eYFP<sub>C</sub>, DELLA2-eYFP<sub>C</sub>,DELLA3-eYFP<sub>C</sub>分别与 NSP2-eYFP<sub>N</sub>共注射烟草叶片可以观察到 YFP 荧光。标尺为 100 μm。A. Interactions between DELLAs and NSP2 were detected in yeast. Among them,DELLA1 to DELLA3 were fused to pGADT7 as target plasmid,and NSP2 was fused to pGBKT7 as bait plasmid. The bait plasmid in Y187 strain,the target plasmid in the AH109 strain,the diploid yeast obtained by sexually mating grew on media with SD/-Trp-Leu and SD/-Trp-Leu-His-Ade. The combination of p53/SV40 and Lam/SV40 were used as positive control and negative control. B.Detection of protein-protein interactions in *N. benthamiana* leaf epidermal cells by BiFC. YFP fluorescence of leaves co-transformed with NSP2-eYFP<sub>N</sub> and DELLA1-eYFP<sub>C</sub>,DELLA2-eYFP<sub>C</sub> or DELLA3-eYFP<sub>C</sub>. Scale bars=100 μm.

图 3 DELLAs 和 NSP2 间的相互作用

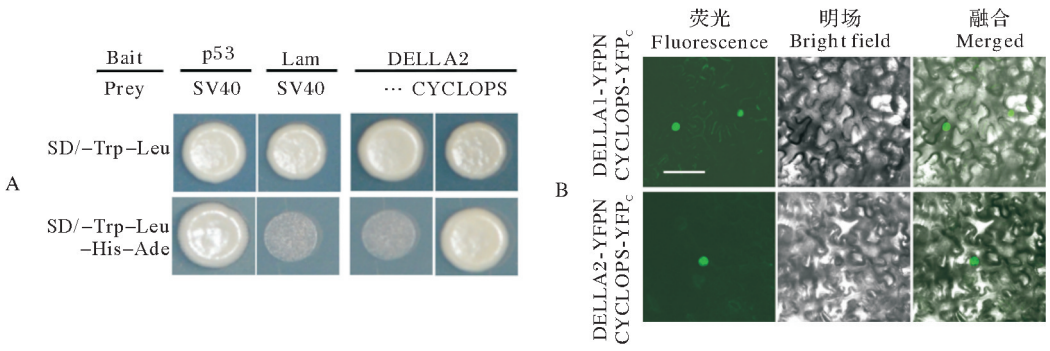
Fig.3 Interactions between NSP2 and DELLAs

发生在细胞核中。上述结果表明在百脉根中 DEL-  
LAs 与 NSP2 间的互作可能形成蛋白复合体调控共  
生过程,其结果与苜蓿中<sup>[7]</sup>是一致的。

2.4 百脉根 CYCLOPS 和 DELLAs 间的相互作用

百脉根 CYCLOPS 是发现的第 1 个 CCaMK 磷  
酸化靶蛋白,该基因突变导致根瘤菌侵染线受阻使  
细菌聚集于“牧羊拐”根毛顶部呈“独眼龙 (cy-  
clops)”状而得名<sup>[5,15]</sup>。在苜蓿中,CYCLOPS 同源  
物 IPD3 能与 DELLAs 互作而形成 CCaMK/IPD3/  
DELLA 复合物<sup>[7]</sup>。为了验证百脉根 CYCLOPS 和

DELLA 间的互作,选取与苜蓿 MtDELLA2 同源性  
最高的百脉根 DELLA2 进行酵母双杂交实验。结  
果显示,分别含 2 个蛋白的菌株杂交后可以在  
SD/-Trp-Leu-His-Ade 的平板上生长,而单  
独的 DELLA2 则不能生长(图 4A)。同时,BiFC 结  
果也显示,当 CYCLOPS 分别和 DELLA1、DELLA2  
共注射烟草叶片时,在烟草表皮叶肉细胞核中均可观  
察到荧光(图 4B),说明百脉根 CYCLOPS 可以与  
DELLA 相互作用。其结果与在苜蓿中所得结果一  
致,表明这种互作关系在豆科植物中具有保守性。



A.在酵母中检测 CYCLOPS 与 DELLA2 的相互作用。将含有 CYCLOPS 靶质粒的菌株分别和含有 DELLA2 诱饵质粒的菌株通过有性交配得到二倍体酵母并涂布于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 的培养基上生长。p53/SV40 和 Lam/SV40 组合分别作为阳性对照和阴性对照。B.在烟草叶片表皮细胞中通过 BiFC 技术检测蛋白质间的相互作用。将 DELLA1-eYFP<sub>N</sub>,DELLA2-eYFP<sub>N</sub> 分别和 CYCLOPS-eYFP<sub>C</sub> 共注射烟草叶片可以观察到 YFP 荧光。标尺为 100 μm。 A. The interaction between CYCLOPS and DELLA2 was detected in yeast, DELLA2 was fused to pGADT7 as a target plasmid, and CYCLOPS was fused to pGBKT7 as a bait plasmid. The bait plasmid in Y187 strain, the target plasmid in the AH109 strain, the diploid yeast obtained by sexually mating grew on media with SD/-Trp-Leu and SD/-Trp-Leu-His-Ade. The combination of p53/SV40 and Lam/SV40 were used as positive control and negative control. B. Detection of protein-protein interactions in *N. benthamiana* leaf epidermal cells by BiFC. YFP fluorescence of leaves co-transformed with DELLA1-eYFP<sub>N</sub>,DELLA2-eYFP<sub>N</sub> and CYCLOPS-eYFP<sub>C</sub>. Scale bars=100 μm.

图 4 CYCLOPS 和 DELLAs 的相互作用

Fig.4 Interactions between CYCLOPS and DELLAs

3 讨论

豆科植物和根瘤菌形成共生体,共生体形成的过程需要一系列的信号组分调控,其中转录因子在早期共生信号下游起着很重要的调控作用。鉴定多个转录因子间的相互作用是解析关键共生基因表达调控机制的先决条件。本研究利用酵母双杂交和 BiFC 系统,研究百脉根调控起始结瘤基因 *NIN* 表达的转录因子间的相互作用。在这些转录因子中,NSP2、NSP1、CYCLOPS 可能直接参与豆科植物的共生过程,其基因突变都导致植株丧失结瘤能力或根瘤菌侵入受阻;DELLA 在植物激素 GA 信号途径中与 PIF3、PIF4 等转录因子互作,抑制其转录活性<sup>[16]</sup>。而在豆科植物苜蓿中,发现它能与 NSP2 和

CYCLOPS 互作,参与调控根瘤和丛枝菌根共生;MYB 家族蛋白参与调控多种生物学过程,如胁迫反应、生长发育、分化、防御反应等<sup>[17-19]</sup>。在百脉根中,IPN2 是 APL 的同源蛋白,可直接结合 *NIN* 启动子并与 NSP2 互作调控根瘤发育。本研究结果显示,百脉根 IPN2 与 DELLA、NSP2 与 DELLA、CYCLOPS 与 DELLA 均有相互作用,表明 IPN2、DELLA 可能参与并形成一个大的蛋白复合物,网络调控豆科植物起始结瘤基因的时空表达。具体的转录调控机制有待于进一步深入的研究。

参 考 文 献

[1] 汪涛,冯勇,张忠明.百脉根 LjSERKs 基因家族在根瘤共生中的功能鉴定[J].华中农业大学学报,2018,37(2):9-15.

- [2] 梅江鹏,李豪,张忠明.拟南芥中根瘤共生基因线路的搭建及其表达分析[J].华中农业大学学报,2018,37(2):28-33.
- [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] SCHAUSER L,ROUSSIS A,STILLER J,et al. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules[J]. Nature,1999,402(6758):191-195.
- [5] OLDROYD G E,DOWNIE J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes[J]. Annu Rev Plant Biol,2008,59(1):519-546.
- [6] SOYANO T,HAYASHI M. Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis[J]. Curr Opin Plant Biol,2014,20:146-154.
- [7] JIN Y,LIU H,LUO D,et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways[J]. Nat Commun,2016,7:12433. <https://www.nature.com/articles/ncomms12433>.
- [8] GLEASON C,CHAUDHURI S,YANG T,et al. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition[J]. Nature,2006,441(7097):1149-1152.
- [9] HIRSCH S,KIM J,MUNOZ A,et al. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula* [J]. Plant cell,2009,21(2):545-557.
- [10] SINGH S,KATZER K,LAMBERT J,et al. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development[J]. Cell Host Microbe,2014,15(2):139-152.
- [11] KANG H,CHU X,WANG C,et al. A MYB coiled-coil transcription factor interacts with NSP2 and is involved in nodulation in *Lotus japonicus* [J]. New Phytol,2014,201(3):837-849.
- [12] 胡晓晶.百脉根结瘤信号通道蛋白 NSP1/NSP2 相互作用的研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [13] WAADT R,SCHMIDT L K,LOHSE M,et al. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta[J]. Plant J,2008,56(3):505-516.
- [14] PIMPRIKAR P,CARBONNEL S,PARIES M,et al. A CcAMK-CYCLOPS-DELLA complex activates transcription of RAM1 to regulate arbuscule branching[J]. Curr Biol,2016,26(8):987-998.
- [15] YANO K,YOSHIDA S,MUELLER J,et al. CYCLOPS,a mediator of symbiotic intracellular accommodation[J]. PNAS,2008,105(51):20540-20545.
- [16] FENG S,MARTINEZ C,GUSMAROLI G,et al. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins[J]. Nature,2008,451(7177):475-479.
- [17] AMBAWAT S,SHARMA P,YADAV N R,et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses:an overview[J].Physiol Mol Biol Plants,2013,19(3):307-321.
- [18] 李慧平,王庆竹,汤玮玮,等.马尾松 PmMYB169 基因亚细胞定位及其超表达烟草低磷抗性分析[J].华中农业大学学报,2018,37(4):58-64.
- [19] BONKE M,THITAMADEE S,MAHONEN A P,et al. APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis* [J]. Nature,2003,426(6963):181-186.

## Identification of interaction between transcription factors involved in initiation of nodulation in *Lotus japonicus*

FAN Yuqian XIAO Aifang ZHANG Zhongming

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

**Abstract** Yeast two-hybrid assay and bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) were performed to identify the interaction of these transcription factors IPN2,NSP2,CYCLOPS,and DELLA involved in regulating the expression of the symbiotic gene during nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. The results showed that *Lotus* DELLA interacted with IPN2,NSP2,and CYCLOPS,indicating that IPN2 and DELLA may form a large protein complex to regulate the spatial-temporal expression of the nodule inception gene in legumes.

**Keywords** *Lotus japonicus*; transcription factor; nodule inception (*NIN*); yeast two-hybrid; bimolecular fluorescence complementation(BiFC)

(责任编辑:张志钰)