

紫云英 2 个转脂蛋白基因在共生及重金属镉胁迫条件下的表达特征

赵彩春 李一星 陈大松 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用实时荧光定量 PCR 技术,研究了紫云英共生表达的非特异性转脂蛋白编码基因 *AsE246* 和 *AsIB259* 在根瘤发育和固氮过程中的组织和时空表达特征,并初步考察了其在重金属镉胁迫条件下表达水平的变化。结果表明:2 个目标基因仅在紫云英根瘤中特异表达,并且均在接种华癸中慢生根瘤菌 7653R 后 22 d 左右表达量达到最高。在低浓度重金属镉胁迫条件下,*AsE246* 和 *AsIB259* 在处理早期的表达量明显升高。在低或高镉胁迫条件下,在处理中期其表达量均显著低于正常根瘤,在处理后期则维持在较低水平,表明它们参与紫云英应对镉胁迫的应答机制。

关键词 紫云英; 转脂蛋白基因; 共生体; 表达特性; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0018-05

LTP(lipid transfer protein)是广泛存在于植物、动物和微生物中的一类脂质转移蛋白,其共同特征是含有 8 个位点高度保守的半胱氨酸残基。根据蛋白特性、相对分子质量和等电点等一些特征,可分为 LTP1 和 LTP2 2 个家族^[1-2],大多数植物的 LTP 属于 LTP1 家族。大量研究表明:LTP1 在植物的生长发育过程中可能具有多种功能,包括参与脂类的转运^[3]、参与植物角质层和蜡质层的合成^[4]、增加细胞壁的延展性^[5]、参与植物对病原菌的防御反应^[1]、与植物抵抗非生物胁迫^[6]及花粉成熟^[7]有关等。LTPs 基因属于一个小的多基因家族,不同的 LTPs 基因编码相似的蛋白质,同一家族不同的成员具有不同的表达模式,同时每个基因的表达模式受植物的生长发育阶段、解剖结构、生物或非生物胁迫的影响。水胁迫、重金属处理、寒冷、干旱或病原物侵染和盐胁迫等都会诱导 LTPs 基因的表达,而且个体的表达水平与植株的生长阶段、组织类型及作用因素有着密切关系^[8]。

前期研究中,通过抑制差减杂交技术,分离获得了紫云英根瘤特异或增强表达的 13 个新基因及其全长 cDNA;序列分析表明,其中 2 个基因 *AsE246*

和 *AsIB259* 编码非特异性脂质转运蛋白 nsLTP1,与多种植物的 LTP1 氨基酸序列具有较高的同源性^[9]。吴梅等^[10]还发现在紫云英与华癸中慢生根瘤菌共生体系中增强表达的结瘤素基因对共生固氮具有重要作用。因此,在根瘤中特异或增强表达的 LTP 基因,很大可能也在豆科根瘤的共生固氮中具有重要作用,然而目前人们对其具体功能及作用机制的认识还远远不够。本试验研究紫云英共生表达的非特异性转脂蛋白编码基因 *AsE246* 和 *AsIB259* 在根瘤发育和固氮过程中的组织和时空表达特性,探讨根瘤特异的转脂蛋白基因是否参与非生物因素重金属的胁迫应答,旨在为深入研究其在共生固氮和胁迫应答中的功能及机制提供基础和依据。

1 材料与amp;方法

1.1 共生体形成有关的菌株

华癸中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii* 7653R)和摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*)均来自华中农业大学农业微生物学国家重点实验室共生固氮课题组保存的纯化菌株。

1.2 根瘤等器官组织材料收集

按照文献^[11]处理紫云英种子,采用双层盆钵

收稿日期:2010-03-25

基金项目:国家“973”计划“生物固氮作用的分子机理研究”(2010CB126500)

赵彩春,硕士研究生。研究方向:根瘤菌共生固氮体系分子机理。E-mail: zhaocaichun@163.com

通讯作者:李友国,博士,教授,博士生导师。研究方向:生物固氮、农业环境微生物。E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

法种植紫云英,并浇灌 Fahraeus 无氮营养液,紫云英植株长出第1片真叶时向试验组接种华葵中慢生根瘤菌 7653R,对照组不接菌,每组每个取材点不低于3个重复。在接种根瘤菌后根瘤发育不同时期收取紫云英根瘤、去瘤根、茎和叶等器官组织材料。

1.3 菌根组织材料收集

在盆栽钵的下层装入灭菌砂土混合物(等质量砂土混合)至70%的高度,平铺1层AM真菌接种剂,再覆盖灭菌土,种入发芽的紫云英,每盆栽4株,分2个组:对照组和处理组,对照组加全磷营养液,试验组加无磷营养液。每处理各3个重复。恒温室培养,温度20~28℃,每天12h光照,并浇适量蒸馏水。第7周收取紫云英根段,通过染色确定其菌根真菌的侵染。

1.4 重金属镉胁迫试验

紫云英植株接种华葵中慢生根瘤菌4d后,浇灌含不同浓度镉离子的无氮营养液,2个处理组分别为9、45 μmol/L,不含镉离子为对照组,每组不低于3个重复。按接种根瘤菌后根瘤发育不同时期收取紫云英根瘤、去瘤根、茎和叶等器官组织材料。

1.5 总RNA抽提和cDNA合成

按照 Invitrogen 公司试剂盒说明书用 Trizol 法抽提各材料总RNA,并用 Dnase I 消化处理RNA,排除基因组DNA干扰后,紫外分光光度计检测浓度及纯度。整个操作过程中所用试剂为 RNase free,所用耗材均用0.1%的DEPC水处理烘干后使用。取3 μL总RNA,按照反转录试剂盒(Fementas公司)提供的操作程序反转录合成第1链cDNA,并且PCR扩增保守基因泛素序列上游引物5' ATG CAG ATC TTT TGT GAA GAC 3' 下游引物:5' ACC ACC ACG GAA GAC GGA G 3'以验证cD-

NA合成是否成功。

1.6 目标基因的组织 and 时空表达检测

按照在NCBI数据库中登记的紫云英 *AsE246* (DQ199648)基因序列设计上游引物5'CCCAAGCAAAGAATAAATAG3'和下游引物5' CACCACTTCACGGCAACT3';按照紫云英 *AsIB259* (DQ199649)基因序列设计上游引物5'TCTTTCTGCTGCTGTTGC3'和下游引物3'CGGAGCAGTAGAGTGAGC5'。以18S rRNA为内参基因(AF3595597)设计上下游引物:5'GTATGGTCGCAAGGCTGAAAC3'及5'TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT3'。基于上述各组总RNA样品,以反转录合成的第1链cDNA为模板,采用SYBER Green荧光染料实时定量PCR方法检测该基因在紫云英的器官组织表达和根瘤发育固氮过程中的时空表达动态。同时,采用相同方法初步检测2个基因在菌根共生体中的表达特征。

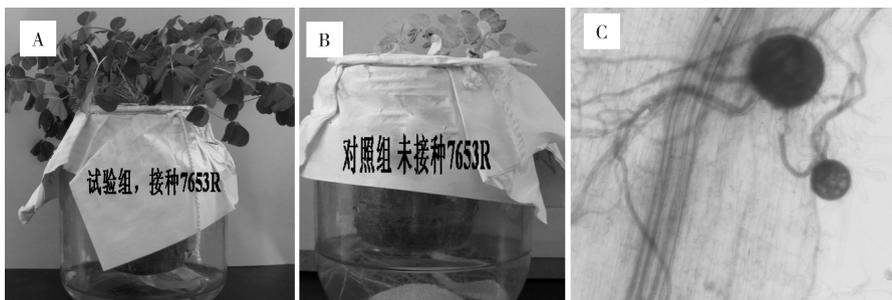
1.7 镉胁迫条件下的目标基因表达检测

以SYBER Green荧光染料实时定量PCR方法,检测目标基因在9、45 μmol/L镉浓度胁迫条件下,在紫云英共生根瘤中的表达变化。操作方法和引物同本文“1.5”和“1.6”。

2 结果与分析

2.1 盆栽试验、总RNA抽提及其质量控制结果

紫云英与华葵中慢生根瘤菌7653R互作形成固氮根瘤,接种根瘤菌的紫云英植株生长良好,未接种的紫云英植株矮小发黄。同时,紫云英可与丛枝菌根真菌互作形成菌根共生体,接种菌根真菌的紫云英植株长势良好,根段TB染色显示侵染成功(图1)。



A:形成正常固氮根瘤 Formation of normal nitrogen-fixing nodules; B:对照组,不形成结瘤 Negative control, non nodules formed; C:菌根感染 TB染色鉴定 Identification of mycorrhizal infection with TB staining.

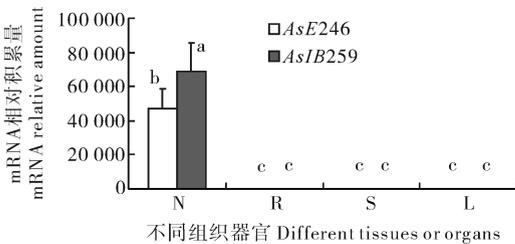
图1 紫云英与华葵中慢生根瘤菌7653R以及菌根真菌互作的植物盆栽及根段TB染色试验

Fig. 1 The pot plant experiments for *Astragalus sinicus* interating with *Mesorhizobium huakuii* 7653R and *Glomus mosseae* respectively

按照常规的 Trizol 抽提方法,制备预先收集保存的不同组织材料的总 RNA,经 Dnase I, 37 °C、5 min 消化处理基因组 DNA 后,用紫外分光光度计检测浓度和纯度, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} \approx 1.9$, 表明其纯度高,满足后续 RT-PCR 的质量要求。进一步反转录合成 cDNA 模板,PCR 扩增组成型表达的泛素参照基因,条带清晰,说明反转录成功。这些操作和检测充分保障了制备 RNA 和反转录 cDNA 的质量和可靠性。

2.2 目标基因在器官组织中的表达特征

以紫云英根瘤、去瘤根、茎和叶组织的总 RNA 为模板,利用设计的特异性引物,通过 RT-PCR,分别扩增 *AsE246* 和 *AsIB259* 目标基因。电泳检测结果显示:2 个基因仅在根瘤中表达,获得了预期大小的特异性条带。*AsE246* 的扩增片段为 121 bp, *AsIB259* 的扩增片段为 141 bp。进一步采用实时定量 PCR,检测分析目标基因在紫云英根瘤等组织器官中的表达水平(图 2),结果表明 2 个基因属于根瘤特异性表达的共生固氮基因,在根、茎和叶中均不表达。



N: 根瘤 Nodule; R: 根 Root; S: 茎 Stem; L: 叶 Leaves;

误差线为标准差,英文字母表示用 Duncan's 多重比较法做统计学分析后,在 $P=0.05$ 水平上的差异显著性,下同。The bars represent standard deviation, the letters show the significance difference at the level of $P=0.05$ with the Duncan's multiple comparison method, the same as below.

图 2 目标基因 *AsE246* 及 *AsIB259* 组织表达的定量 PCR 检测分析

Fig. 2 The tissue-expression pattern analyses for target genes *AsE246* and *AsIB259* by using quantitative PCR

2.3 目标基因在根瘤发育和固氮过程中的表达动态

首先依据 RNA 浓度将紫云英不同时期根瘤及各器官 cDNA 调节到一致浓度,然后取部分 cDNA 稀释为 5 个浓度梯度,以 18S rRNA 为内参基因,制作荧光定量相对标准曲线,以优化实时定量 PCR 反应条件。根据获得的最适条件分别进行 2 个目标基因在各样品中表达水平的荧光定量分析。结果显示:接种华癸中慢生根瘤菌 7653R 后, *AsE246* 在

22 d 左右表达量相对最高,表达量较其他时期高出近 20 倍,早期到中期呈现上升趋势,中期至晚期呈下降趋势(图 3)。*AsIB259* 的表达总体趋势与 *AsE246* 相似,亦呈现中期表达量相对较高的趋势,但整体表达量差异不及 *AsE246* 明显,大部分表达量差异小于 2 倍(图 4)。

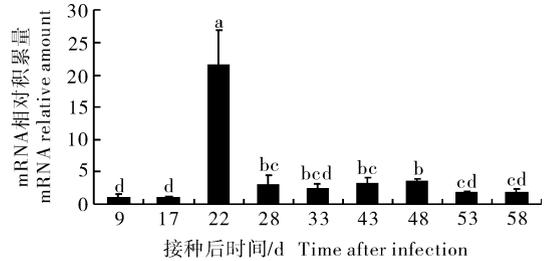


图 3 *AsE246* 在根瘤发育固氮过程中的动态表达
Fig. 3 The dynamic expression pattern of *AsE246* during nodule development and nitrogen fixation process

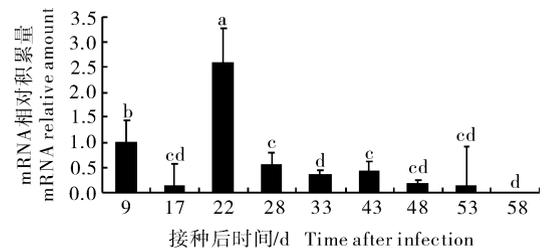


图 4 *AsIB259* 在根瘤发育固氮过程中的动态表达(相对表达量)

Fig. 4 The dynamic expression pattern of *AsIB259* in nodule development and nitrogen fixation process

2.4 目标基因在菌根共生体的表达检测

由于紫云英还可与菌根真菌共生形成菌根共生体,考虑到根瘤和菌根 2 种共生体形成过程中可能存在宿主参与、共生诱导表达的共同基因,检测了目标基因在菌根中的表达状况。首先使用试验组菌根、茎叶及对照组根 cDNA 为模板,PCR 扩增泛素以验证反转录 cDNA 模板的可靠性;同时将根瘤 cDNA 作为阳性对照,以排除 PCR 条件的影响;再分别使用 *AsE246* 和 *AsIB259* 特异引物进行 RT-PCR,PCR 产物结果显示,在紫云英与丛枝菌根真菌互作形成的菌根共生体中没有检测到这 2 个基因的表达,进一步说明目标基因是共生根瘤中特异表达的功能基因,与共生固氮作用关系密切。

2.5 目标基因应对重金属镉胁迫条件下的表达变化

以 2 种不同浓度镉处理下不同时期的根瘤总 RNA 为模板,分别进行 *AsE246*、*AsIB259* 的荧光定量检测分析,结果(图 5)显示:接种根瘤菌后第 9

天,即镉胁迫后第 5 天,*AsE246* 在 $9 \mu\text{mol/L}$ 低浓度镉处理时表达量较对照组明显升高,在 $45 \mu\text{mol/L}$ 高浓度镉处理时表达量与对照组接近。在接种根瘤菌后第 24 天,即镉胁迫后第 20 天,不管低浓度还是高浓度镉胁迫下,其表达量与对照比较均显著下降;在接种根瘤菌后第 33 天,即胁迫后第 29 天,低浓度镉处理下 *AsE246* 的表达仍然处于相对较高的水平,而在高浓度镉处理时,其表达量下降至与对照组接近。对照组中 *AsE246* 的时空表达特征与图 3 结果完全吻合。但在高浓度镉胁迫时,该基因的表达量在整个根瘤发育和固氮过程都很低(图 5)。

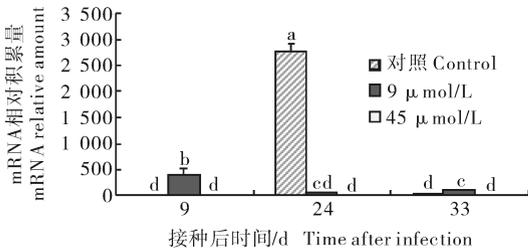


图 5 *AsE246* 在镉胁迫条件下不同时期根瘤中表达的定量分析

Fig. 5 Quantitative analysis of *AsE246* expression in nodules of different terms under cadmium stress conditions

总体上,在镉胁迫条件下 *AsIB259* 在不同时期根瘤中的表达特征与 *AsE246* 相似。由图 6 可见,没有添加镉胁迫的对照组中,*AsIB259* 表达趋势与图 4 结果吻合;接种根瘤菌后第 9 天,*AsIB259* 在低浓度镉处理组中的表达量明显升高,高浓度镉处理组中的表达量也有所上升;接种根瘤菌后第 24 天,*AsIB259* 在镉处理组中的表达量均显著低于正常对照组;但是在接种根瘤菌后第 33 天,低浓度镉处理组中的 *AsIB259* 表达仍然处于相对较高水平,高浓度镉处理时,其表达量下降,且低于无胁迫对照水平(图 6)。

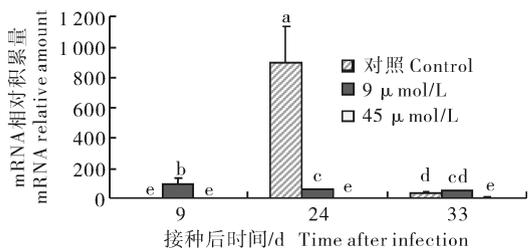


图 6 *AsIB259* 在镉胁迫条件下不同时期根瘤中表达的定量分析

Fig. 6 Quantitative analysis of *AsIB259* expression in nodules of different terms under cadmium stress conditions

3 讨论

AsE246 和 *AsIB259* 的组织空间表达的定量检测结果显示:它们只在根瘤中特异、高效表达,而在紫云英茎叶等组织和去瘤根中不表达,在菌根共生体中亦不表达,直接说明了其基因表达具有严格的组织器官特异性,从一个侧面说明了这 2 个基因与根瘤发育和固氮功能有关;*AsE246* 和 *AsIB259* 在根瘤中的时空动态表达特征基本相似,均在接种根瘤菌后第 22 天左右表达量达到最高,此时正是紫云英成熟根瘤固氮的旺盛时期。但这 2 个基因在接菌第 40 天之后表达水平明显下降,而此阶段的根瘤开始进入衰老,固氮能力开始减弱。再次说明这 2 个转脂蛋白基因与紫云英根瘤的共生固氮密切相关。值得注意的是,*AsIB259* 在早期(第 9 天)具有一个相对较高的表达水平,我们推测该基因可能还与根瘤菌早期感染和根瘤形成有关。

近年来,许多研究报道 *LTP* 参与植物应对环境胁迫,具有防御功能。陈大松等^[6]研究了紫云英共生固氮基因在铵胁迫及盐胁迫下的表达,结果表明 *AsE246* 在 NaCl 胁迫下,其转录量上升,高于无胁迫正对照的水平。本研究中的镉胁迫试验结果显示,在低浓度镉胁迫条件下,在处理早期目标基因的表达量明显升高。然而在高、低浓度镉处理组中期目标基因的表达水平显著低于正常根瘤,并一直维持在较低水平。我们推测在这种情况下,紫云英根瘤的固氮作用将受到抑制和显著影响^[12],事实上在后期对共生固氮表型的观察中确实可见,在高浓度镉处理组中的紫云英地上部分长势明显区别于正常对照组。在低浓度镉胁迫时,紫云英植株感应到环境刺激,启动胁迫应答,*AsE246* 表达量明显升高。然而,高浓度的镉胁迫处理时,目标基因在整个根瘤发育和固氮过程中被强烈抑制,表达水平一直很低。基于这些结果,我们认为重金属镉对于根瘤共生固氮的抑制作用,可能是抑制了该过程中重要功能基因的表达水平,如 *nsLTP1* 编码的基因,进而影响根瘤的固氮能力。

本研究结果表明 *AsE246* 和 *AsIB259* 是紫云英与华癸中慢生根瘤菌 7653R 共生特异表达的功能基因,参与紫云英根瘤发育和固氮,而且还与应答镉胁迫环境因素有关。但是要揭示和阐明此类 *LTP* 的具体功能和调控机制、如何启动应对不利环境因素的防御应答,还需要后续深入全面的分子、蛋白水平和生理生化等层面的研究。

参 考 文 献

- [1] CARVALHO A, GOMES V. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology; a concise review[J]. *Peptides*, 2007, 28(5):1144-1153.
- [2] SAMUEL D, LIU Y J, CHENG C S, et al. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*)[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):35267-35273.
- [3] KADER J C. Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 380(1):31-44.
- [4] CAMERON K D, TEECE M A, SMART L B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(1):176-183.
- [5] NIEUWLAND J, FERON R, HUISMAN B A, et al. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(7):2009-2019.
- [6] CHEN D S, LI Y G, ZHOU J C. The symbiosis phenotype and expression patterns of five nodule-specific genes of *Astragalus sinicus* under ammonium and salt stress conditions[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(8):1421-1430.
- [7] KIM S, MOLLET J C, DONG J, et al. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism [J]. *PANS*, 2003, 100(26):16125-16130.
- [8] LIU K, JIANG H, MOORE S L, et al. Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*[J]. *Planta*, 2006, 223(4):672-683.
- [9] CHOU M X, WEI X Y, CHEN D S, et al. Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(11):2673-2685.
- [10] 吴梅, 丑敏霞, 李一星, 等. 参与紫云英共生固氮的1个上调表达结瘤素基因 AsB6 的分离与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(2):169-174.
- [11] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 206-208.
- [12] CHEN Y X, HE Y F, YANG Y, et al. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation[J]. *Chemosphere*, 2003, 50:781-787.

Expression patterns of two lipid transfer protein encoding genes of *Astragalus sinicus* under symbiosis and heavy metal cadmium stress conditions

ZHAO Cai-chun LI Yi-xing CHEN Da-song LI You-guo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *AsE246* and *AsIB259* were two root nodule-specific expressed nodulin genes encoding nsLTP1 (non-specific lipid transfer protein 1). The temporal-spatial expression characteristics of two target genes during root nodule development and nitrogen fixation process were investigated with real-time quantitative PCR. Meanwhile, the dynamic changes of expression level of target genes under heavy metal cadmium stress condition were also examined. The results showed that two target genes were strictly expressed in symbiotic organ-root nodules, and reached the peak level at about 22 days after inoculation of *Mesorhizobium huakuii* 7653R. It was also found that the expression levels of *AsE246* and *AsIB259* were significantly increased during the early stage as a response to low-level-cadmium stress. However, either at low- or high-level-cadmium stress conditions, their expression were significantly suppressed during the interim stage of Cd²⁺ stress treatment compared with those in normal nodules, and continued to maintain a relative lower level until the final stage. These indicated the two nsLTP1 genes could play a fundamental role in the response mechanism of *A. sinicus* to cadmium stress. In this work, some convincing data were obtained to confirm that *AsE246* and *AsIB259* were specific expressed nsLTP1 genes in *A. sinicus* root nodules.

Key words *Astragalus sinicus*; lipid transfer protein encoding gene; symbiont; expression pattern; real-time qPCR

(责任编辑:张志钰)