

百脉根小 GTPase ROPs 基因反转座子 插入突变体的分离和鉴定

李碧璇 张 晴 朱 辉 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 为研究 ROP(Rho-related GTPase of plants, ROP)在豆科植物共生固氮过程中的功能和作用机制,从百脉根逆转录转座子 LORE1 插入突变体库(<http://www.kazusa.or.jp/lotus>)中搜索到 6 个 ROP 相关基因突变体,通过分离和鉴定,得到不同突变体的 M1 代和 M2 代纯合体种子,对 M2 代进行表型鉴定及统计分析。结果表明:在早期共生表型的鉴定中,突变体与野生型植株相比,*rop-like1* 植株的根瘤原基数明显下降,*rop-like4* 植株的侵入线数和侵入线密度也明显下降;但仅 *rop-like1* 植株在接种 14 d 后的结瘤数明显减少。

关键词 百脉根; LORE1; 反转录转座子; ROPs

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0045-08

在高等动、植物中广泛存在一类分子质量 20~40 ku 的小 G 蛋白并具有 GTPase 酶活性,不同于真菌和动物的小 G 蛋白,在植物中发现的小 G 蛋白命名为 ROP(Rho-related GTPase of plants)^[1]。已有的研究表明,小 G 蛋白 ROPs 是植物生长发育中重要的分子开关,在细胞形态发育、细胞极性、细胞骨架和囊泡运输、植物与微生物互作等生理过程都起到关键的调控作用^[2-4]。豆科植物中发现一些根瘤特异表达的小 GTPase^[5],在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中,接种根瘤菌后 *MtROP3*、*MtROP5* 和 *MtROP6* 表达量上调, *MtROP8* 表达量急剧下降^[6],而 *MtROP10* 是根毛极性生长和根瘤菌诱导根毛变形所必需的,同时控制着根瘤菌入侵^[7]。前期研究发现,百脉根(*Lotus japonicus*)ROP6 能与结瘤因子受体 NFR5 相互作用,参与调控根瘤菌感染和根瘤发育^[8],同时参与调控网格蛋白囊泡的形成并介导结瘤因子受体复合物的内吞作用^[9]。

为了探明 ROPs 在豆科植物共生固氮过程中的功能和作用机制,本研究利用日本和丹麦构建的百脉根反转座子 LORE1 插入突变体库(<http://www.kazusa.or.jp/lotus>; <http://users-mb.au.dk/pmgrp>)搜索到的 *rop6*、*rop-like1*、*rop-like2*、*rop-like3*、*rop-like4* 及 *rop-like5* LORE1 插入突变体,

通过分离得到纯合突变体,经盆栽结瘤试验鉴定和分析突变体共生表型,以期为进一步揭示 ROPs 在根瘤菌感染、根瘤器官发生和发育、共生固氮过程中的功能及调控机制提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

百脉根 *rop6*、*rop-like1*、*rop-like2*、*rop-like3*、*rop-like4* 及 *rop-like5* LORE1 插入突变体株系 M₁ 代由丹麦奥胡斯大学 Centre for Carbohydrate Signalling and Recognition 提供。百脉根 *L. japonicus* Gifu 种子来自于华中农业大学农业微生物学国家重点实验室。根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 及 *M. loti* MAFF303099/pHC60 来自于中国科学院华南植物园吴国江研究员馈赠,于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 突变体的种植栽培

种子用液氮处理 2 min,再用 0.5%~1% NaClO 处理 12~14 min,然后用无菌 ddH₂O 洗涤 3 次,最后加 2/3 容器体积的无菌 ddH₂O 并置于 4℃ 冰箱暗处理直到种子完全吸胀(12~24 h),将种子移至 1/2MS(或琼脂)平板整齐排列,在光照培养箱里培养,培养条件为温度 23℃/23℃(昼/夜),光照周期

收稿日期: 2016-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170224; 31370278); 农业微生物学国家重点实验室“815”项目(AMLKF200804)

李碧璇, 硕士研究生, 研究方向: 固氮微生物学. E-mail: bixuan_li@163.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

16 h/8 h(昼/夜)光照强度为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,相对湿度 70%,正放平板暗培养 24~48 h 直至下胚轴伸长到合适长度,光照培养至子叶变绿、撑开至适当程度;将幼苗种入高温高压灭菌的珍珠岩+蛭石(体积比为 2:1)混合的基质中培养,使用 1/2 强度无氮培养基 B&D 浇灌植物;待幼苗种植后 5~7 d 接种野生型根瘤菌(*M. loti* MAFF303099),根瘤菌的培养和侵染参照 Tansengco 等^[10]的方法。

1.3 突变体的分离筛选

待幼苗长出 10 片以上真叶,取 1 片幼嫩真叶采用 SDS 法抽提总 DNA,设计引物,对每份样品进行 PCR 扩增鉴定。PCR 程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 6 min。分别使用 *rop6*、*rop-like1*、*rop-like2*、*rop-like3*、*rop-like4* 及 *rop-like5* 基因的特异性引物 F/R 及转座子 LORE1 上引物 P2,鉴定 LORE1 是否插入到染色体上。当引物 F 与 P2 组合扩增出对应大小的 DNA 片段,而引物 F 与 R 组合不能扩增出 DNA 片段时,其植株才是插入的纯合突变体^[11]。通过 PCR 分离纯合体、杂合体和野生型;待植株开花结实后,收获 M_2 代纯合体种子进行鉴定,杂合体种子继续种植,分离纯合体。

1.4 突变体的表型鉴定

种子处理及盆栽试验见本文“1.2”,待幼苗种植后 5~7 d 接种带 GFP 的野生型根瘤菌(*M. loti* MAFF30309910/pHC60),接种第 7 天在荧光显微

镜下观察统计根部侵入线(IT)密度、数量等表型;接种第 14 天统计根部结瘤表型,包括成熟与未成熟瘤数、结瘤密度等。如以上指标与对照有差别,即进行进一步观察和后代遗传分析。

1.5 数据分析

所有数据均以野生型百脉根 Gifu 生长为对照,双尾卡方检验以及 Student’s *t*-test 分析进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 百脉根 *rops* LORE1 插入突变体基因分析

通过搜索百脉根逆转录转座子 LORE1 插入突变体库,获得了包括 *rop6*、*rop-like1*、*rop-like2*、*rop-like3*、*rop-like4* 及 *rop-like5* 共 6 个 LORE1 插入突变体株系(表 1)。对其基因序列以及插入位点前后 1 000 bp 序列进行比对,分析每个株系的 LORE1 插入位点(图 1A)。利用 Mega 5.1 软件进行 *At*(*Arabidopsis thaliana*)、*Mt*(*M. truncatula*)和 *Lj*(*L. japonicus*)ROPs 的氨基酸序列比对,分析各突变体株系之间的同源性,结果发现:除了 *LjROP6* 与 *MtROP6* 同源性较低(59%)外,*LjROP-Like1* 与 *MtROP9*、*LjROP-Like2* 与 *MtROP9*、*LjROP-Like2* 与 *LjROP5*、*LjROP-Like3* 与 *LjRAC2*、*LjROP-Like4* 与 *MtROP10* 以及 *LjROP-like5* 与 *AtROP9* 同源性均较高,分别为 87%、85%、97%、100%以及 100%(图 1B)。

表 1 百脉根 *rops* LORE1 突变体信息统计

Table 1 Summary of *L. japonicus* *rops* LORE1 mutants

基因 Gene	基因 ID(2.5 版) Gene ID(build 2.5)	植物 ID Plant ID	插入位点 Insertion	插入拷贝 Insertion copies	注释 Annotation
<i>rop6</i>	LjSGA_049634.1	30031226	LjSGA_049634_525_F	1	Exon
<i>rop-like1</i>	chr2.CM0272.860.r2.m	30000537	chr2_26578764_F	10	5'UTR
<i>rop-like2</i>	chr1.CM0017.1600.r2.d	30003553	chr1_40439327_R	2	Intron
<i>rop-like3</i>	chr3.CM0160.990.r2.m	30056088	chr3_37962507_R	2	Intron
<i>rop-like4</i>	chr1.CM0166.830.r2.m	30052383	chr1_5234928_R	2	Exon
<i>rop-like5</i>	chr2.CM0660.270.r2.m	30034253	chr2_12813878_F	2	Intron

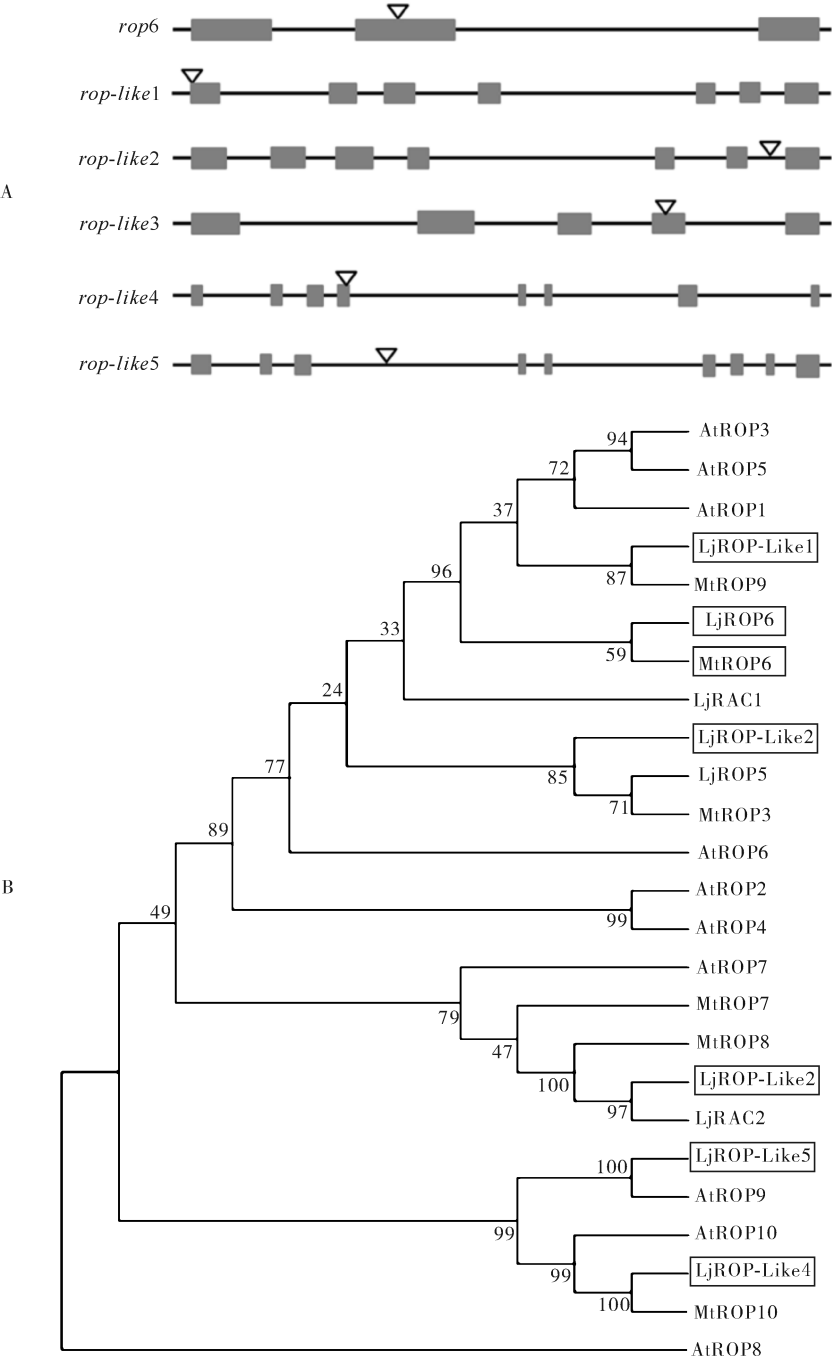
2.2 百脉根 *rops* 突变体的分离和鉴定

将 *rop6*、*rop-like1*、*rop-like2*、*rop-like3*、*rop-like4*、*rop-like5* 等 6 个株系与对照组(Gifu)共计约 300 粒种子,经表面灭菌等常规程序处理后,在 1/2MS(或琼脂)平板萌发。除 Gifu、*rop-like3* 和 *rop-like4* 发芽率达到 90%以上外,其他株系的发芽率均为 60%左右,与对照相比,突变体种子发芽时

间延迟约 2 d。将萌发的种子转移到珍珠岩/蛭石的盆栽钵中,观察各植株生长过程,发现成活的突变体植株在苗期表现出生长缓慢、成株后生活力弱等特点,成株后的叶片颜色、植株分枝及高度也有不同差异(图 2A)。

为了分离得到纯合突变体植株,抽取各株系 DNA 进行 PCR 鉴定(图 2B),结果表明:除 *rop-*

like2、*rop-like3* 未分离得到纯合体外,其余株系均分离得到纯合体。*rop6* 纯合体植株由于不结荚未能收到种子;*rop-like5* 纯合体植株收获到的种子多为瘪粒,数量不足 20 颗,同时发芽率只有 10%,观察到的表型没有统计学意义,故仅培养并收集下一代种子。将其余纯合突变体收到的共计约 300 粒种



A:*rops* LORE1 突变体插入位点分析,方块代表外显子,线段代表内含子,倒三角代表插入位点; B:*rops* LORE1 突变体氨基酸序列系统进化树,该系统进化树运用 Mega5.1 软件最大似然率算法生成。A:Insertion site analysis of *rops* LORE1 mutants,squares represent exons,lines represent introns,inverted triangles represent insertion sites.B:Phylogenetic tree of *rops* LORE1 mutants based on amino acid sequences.This phylogenetic tree was generated using Mega 5.1 program by maximum-likelihood method.

图 1 百脉根 *rops* LORE1 突变体插入位点分析和氨基酸序列系统进化树
Fig.1 Insertion site analysis and phylogenetic tree of *L. japonicus ropS* LORE1 mutants based on amino acid sequences

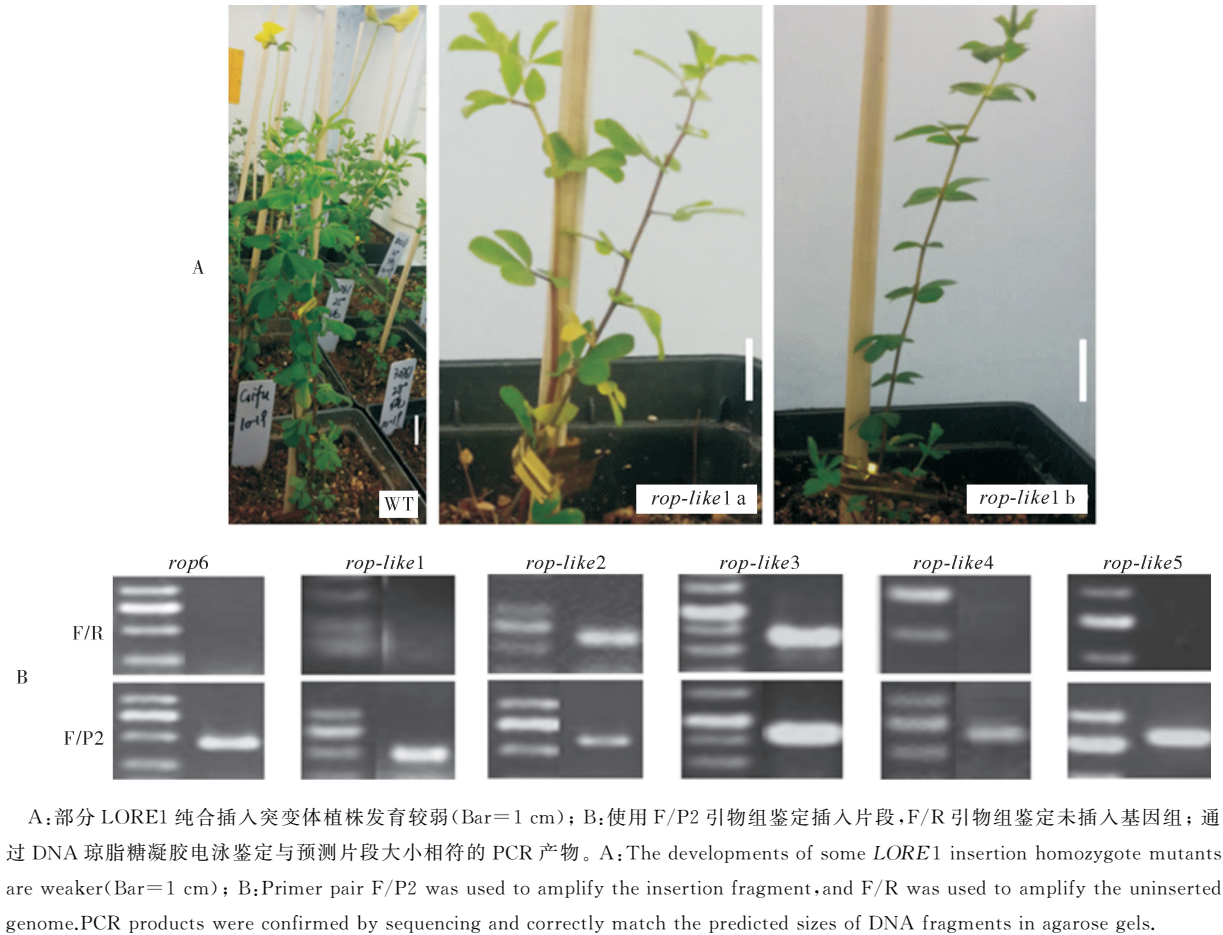


图 2 百脉根 *rops* LORE1 突变体的鉴定与分离

Fig.2 Identification and separation of *L. japonicus rops* LORE1 mutants

子进行种植并鉴定分析 M₂代共生表型。

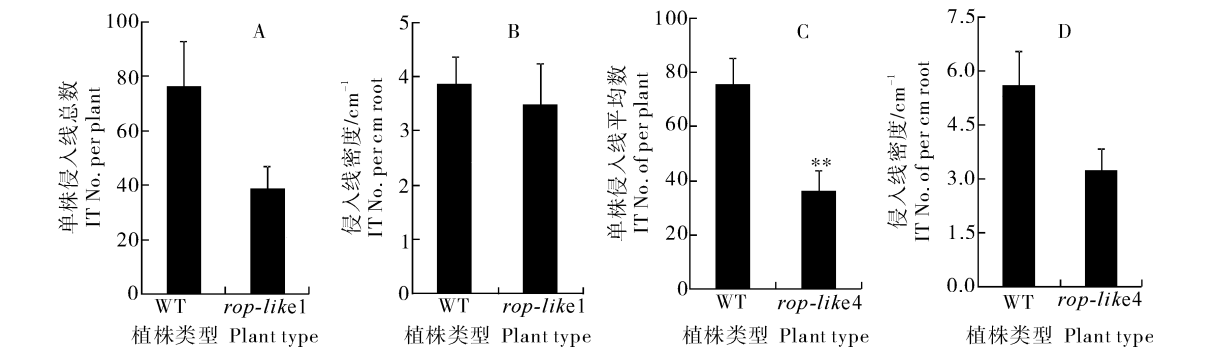
2.3 百脉根 *rops* 突变体对根瘤菌侵染的影响

为了研究 *rops* 突变体能否影响早期结瘤阶段根瘤菌对植物的侵染,从 1 个对照组(Gifu)、2 个 *rops* LORE1 纯合突变体组中各选择约 10 棵生长状态一致的幼苗用于根瘤菌入侵分析,接种带 GFP 标记的根瘤菌并在第 7 天观察。结果表明:在 *rop-like4* 纯合体植株中,虽然根瘤菌能够正常入侵根毛,但是侵入线数量(图 3C)和侵入线密度(图 3D,侵入线总数除以总根系长)均明显减少。另外,还检测了各植株根瘤菌侵入起始的频率并统计了侵入口袋(infection pockets, IP)、侵入线(infection threads, IT)以及根瘤原基(nodule primordia, NP)的数量,结果发现:*rop-like1* 纯合体植株的根瘤原

基数量较对照组相比有显著下降(图 4B),同时还发现了 *rop-like4* 纯合体植株的侵入口袋和侵入线较对照组相比有显著下降(图 4C)。表明在 *rop-like1* 和 *rop-like4* 突变体植株中,根瘤菌的侵染都受到了不同程度的影响。

2.4 百脉根 *rops* 突变体对根瘤形成的影响

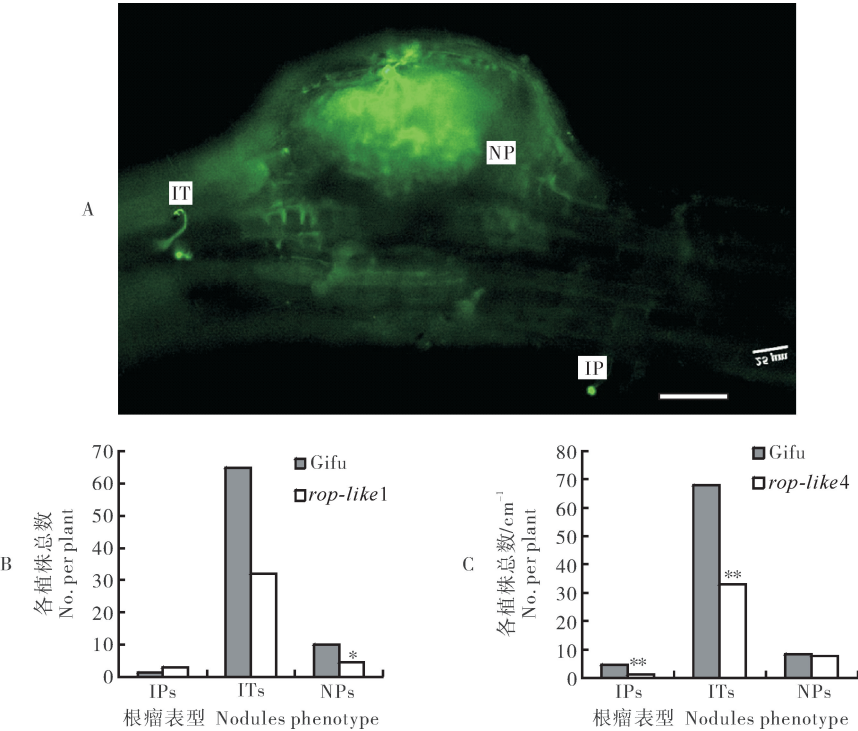
为了探讨 *rops* 突变体后期根瘤的形成是否受到影响,统计并分析了 2 个 *rops* LORE1 纯合突变体在接种 14 d 的结瘤总数(包括成熟瘤和未成熟瘤,图 5A)。结果显示:仅 *rop-like1* 的 M₂代纯合体与对照组相比结瘤数显著下降(图 5B),但 2 个突变体的结瘤密度与对照相比均没有显著差异(图 5C),说明 *rop-like1* 突变体植株根的生长受到影响,导致其虽然结瘤数下降但是结瘤密度并没有差异。



对 *rops* M₂代突变体接种带 GFP 的野生型根瘤菌,接种 7 d 后与对照组比较;A:*rop-like1* 纯合突变体侵入线数; B:*rop-like1* 纯合突变体侵入线密度; C:*rop-like4* 纯合突变体侵入线数;D:*rop-like4* 纯合突变体侵入线密度; * 表示与对照组经 Student's *t*-test 检验的差异显著性 (* : $P<0.05$; * * : $P<0.01$),下同。*rops* M₂ generation mutants were inoculated with *M. loti*, which constitutively expresses GFP. Compared with the control plants 7 d post inoculated with *M. loti*. A: The number of ITs per plant in the *rop-like1* homozygote lines. B: The numbers of ITs per centimeter of *rop-like1* homozygote lines. C: The number of ITs per plant in the *rop-like4* homozygote lines. D: The numbers of ITs per centimeter of *rop-like4* homozygote lines. Asterisks (*) indicate statistically significant differences (* : $P<0.05$; * * : $P<0.01$) between treatments and controls as determined by Student's *t*-test. The same as follows.

图 3 百脉根 *rop-like1* and *rop-like4* 植株对侵入线的影响

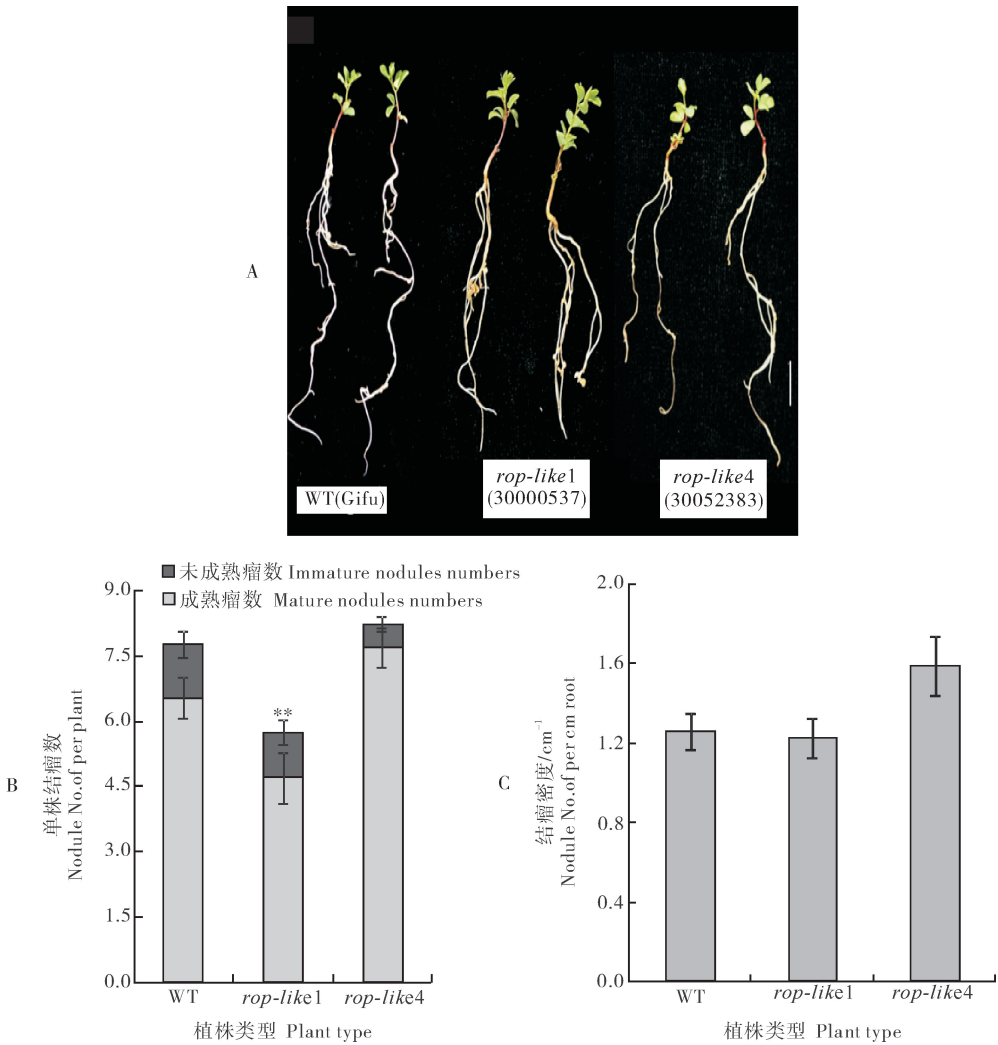
Fig.3 Effects of *L. japonicus rop-like1* and *rop-like4* plants on infection threads



对 *rops* M₂代突变体接种带 GFP 的野生型根瘤菌,接种 7 d 后在荧光显微镜下统计各株系侵入口袋(IP)、侵入线(IT)、根瘤原基数(NP); A:细胞内的绿色荧光表示 IPs、Its、NPs, Bar= 50 μ m; B:*rop-like1* 的 IPs、Its、NPs 总数; C:*rop-like4* 的 IPs、Its、NPs 总数。*rops* M₂ generation mutants were inoculated with *M. loti*, which constitutively expresses GFP. Seven days after inoculation, the numbers of infection pockets (IP), infection threads (IT) and nodule primordia (NP) were recorded under a fluorescent microscope. A: Green signals indicate rhizobium cells in the IPs, ITs or NPs. Bar= 50 μ m. B: Numbers of IPs, ITs and NPs per plant of *rop-like1*. C: Numbers of IPs, ITs and NPs per plant of *rop-like4*.

图 4 百脉根 *rop-like1* 和 *rop-like4* 植株对根瘤菌入侵的影响

Fig.4 Effect of *L. japonicus rop-like1* and *rop-like4* plants on rhizobia invasion



A:正常状态下百脉根 Gifu、*rop-like1* 和 *rop-like4* 根的生长和结瘤情况 (Bar=1 cm)；B:各植株结瘤总数；C:各植株结瘤密度。
A:Normal root growth and nodulation in *L. japonicas* Gifu, *rop-like1* and *rop-like4* M₂ generation mutant plants (Bar=1 cm)；B:Nodule numbers per plant. Nodule numbers per plant reduced significantly in *rop-like1* mutant. C: Nodule numbers of per centimeter.

图 5 百脉根 *rop-like1* 和 *rop-like4* 植株对结瘤的影响

Fig.5 Effect of *L. japonicus rop-like1* and *rop-like4* plants on nodulation

3 讨论

插入突变体是一个广泛应用于植物基因发现和功能探究的有效研究工具^[12],在正向和反向遗传学研究中都发挥着重要作用。ROPs 作为植物重要的分子开关能够控制复杂的细胞过程,包括基因表达、细胞壁合成、H₂O₂ 产生、内吞作用、胞外分泌、胞浆的移动、细胞周期、真核生物器官细胞分化等。在 ROP 家族中,单个的家族成员可能会有很多不同的功能;同时,不同的家族成员也已经分化调节不同的细胞过程,这种现象在高等植物中尤为明显^[13-14]。为了进一步探明小 G 蛋白 ROPs 在微生物与植物

互作中的功能,本研究从百脉根逆转录转座子 LORE1 插入突变体库鉴定到 6 个 ROP 基因相关的 LORE1 插入突变体株系。通过系统进化树分析, LjROP-like1 与 MtROP9、LjROP-like2 与 LjROP5、LjROP-like3 与 LjRAC2、LjROP-like4 与 MtROP10 以及 LjROP-like5 与 AtROP9 同源性均较高,分别为 87%、85%、97%、100%以及 100%;而 LjROP6 与 MtROP6 的同源性相对较低,仅为 59%。

通过 M₁代的分离和筛选,仅 *rop-like2* 和 *rop-like3* 未分离到纯合突变体,而分离到的纯合突变体不仅植株发育较弱,而且出现不结荚(*rop-like1*)或

结荚少且种子干瘪(*rop-like5*)的现象。有研究表明,ROPs 对花粉管的伸长有影响,同时花粉管的伸长在时间上受到 ROPs 活性振荡变化的调节^[15]; ROPs 还能调控植物的发育^[16]。因此,推测以上结果的出现可能与 LORE1 的插入影响了 ROPs 这部分的功能有关。

对获得的 M₂ 代纯合体进行早期和后期的共生结瘤表型鉴定,结果表明:在 *rop-like1* 和 *rop-like4* 植株中,根瘤菌的早期侵染受到了影响;*rop-like1* 在后期的结瘤表型上有显著差异。据报道, MtROP9(LjROP-Like1 与其同源性较近)在 ROS 参与的早期侵染信号途径中扮演重要角色^[17]。在拟南芥中过表达 MtROP10(LjROP-Like4 与其同源性较近)可使根毛变短、变粗甚至出现分叉,推测其对根毛的极性生长以及根瘤菌在侵染过程中的极性定位有重要作用^[18]。本研究结瘤表型结果可能是 LORE1 的插入影响了根瘤菌在侵染过程中信号转导的相关应答,导致植株根瘤原基的形成、根瘤菌的入侵和侵入线的生长受到了影响,并可能最终导致植株侵入线和结瘤数量的减少。

本研究利用百脉根 LORE1 突变体库分离和鉴定了多个 ROPs 相关基因突变体株系的共生表型,并获得了有显著共生表型差异的突变体株系 *rop-like1* 和 *rop-like4*。虽然观察到的表型仍然存在值得商榷的地方,比如突变体可能还有其他的 LORE1 插入拷贝来影响试验结果的可靠性,但本研究结果为探讨 ROP 类小 G 蛋白调控体系在共生信号转导途径中的作用提供了重要参考,并且也提供了突变体材料储备。

参 考 文 献

- [1] SATO S, NAKAMURA Y, KANEKO T, et al. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus* [J]. DNA Res, 2008, 15: 227-239.
- [2] LI H, WU G, WARE D, et al. *Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 407-417.
- [3] WINGE P, BREMBU T, KRISTENSEN R, et al. Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 2000, 156: 1959-1971.
- [4] GELDNER N, FRIML J, STIERHOF Y D. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking [J]. Nature, 2001, 413: 425-428.
- [5] YUKSEL B, MEMON A R. Legume small GTPases and their role in the establishment of symbiotic associations with *Rhizobium* [J]. Plant Signal, Behav, 2009, 4: 257-260.
- [6] LIU W, CHEN A M, LUO L, et al. Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis [J]. J Integr Plant Biol, 2010, 52: 639-652.
- [7] LEI M J, WANG Q, LI X, et al. The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and Nod factor-induced root hair deformation [J]. Plant cell, 2015, 27: 806-822.
- [8] KE D, FANG Q, CHEN C, et al. The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus* [J]. Plant physiology, 2012, 159: 131-143.
- [9] WANG C, ZHU M, DUAN L, et al. *Lotus japonicus* clathrin heavy chain1 is associated with Rho-like GTPase ROP6 and involved in nodule formation [J]. Plant physiology, 2015, 167: 1497-1510.
- [10] TANSENGCO M L, HAYASHI M, KAWAGUCHI M, et al. Crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus* [J]. Plant physiology, 2003, 131: 1054-1063.
- [11] URBANSKI D F, MALOLEPSZY A, STOUGAARD J, et al. Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus* [J]. Plant J, 2012, 69: 731-741.
- [12] 李振鹏, 马春草, 谢福莉, 等. 华葵中慢生根瘤菌 7653R SraG sRNA 的共生固氮功能 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 51-57.
- [13] VERNOUD V, HORTON A C, YANG Z, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2003, 131: 1191-1208.
- [14] YANG Z. Small GTPases: versatile signaling switches in plants [J]. Plant cell, 2002, 14 (Suppl): 375-388.
- [15] HWANG J U, GU Y, LEE Y J, et al. Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16: 5385-5399.
- [16] ZHENG Z L, YANG Z. The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants [J]. Plant molecular biology, 2000, 44: 1-9.
- [17] 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 physiology, 2012, 159: 501-516.
- [18] 谢亚均, 李晓琳, 刘伟, 等. 菰藜苜蓿 MtROP10 基因的克隆及其功能初探 [J]. 生物技术, 2010, 20(5): 9-12.

Isolation and identification of small GTPase *ROPs* retrotransposons insertion mutants in *Lotus japonicus*

LI Bixuan ZHANG Qing ZHU Hui ZHANG Zhongming

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

Abstract Six *ROPs* related gene mutants were found through screening mutants library of the *Lotus* retrotransposons 1 insertion (<http://users-mb.au.dk/pmgrp>). Different homozygote M1 and M2 generation seeds were obtained by the isolation and PCR identification. Results of identification and statistical analysis of M₂ generation symbiotic phenotype showed that the root nodules primordium numbers per plants of *rop-like1* homozygote were significantly decreased compared with those of wild type. Both the numbers and density of infection threads per plant in *rop-like4* homozygote were also significantly decreased. The nodule numbers of *rop-like1* homozygote decreased significantly in comparison with those of wild type after 14 days inoculation. It will provide evidence for further studying *ROPs* function and regulatory mechanism in rhizobium infection and the process and development of nodules organs.

Keywords *Lotus japonicus*; LORE1; retrotransposons; Rho-related GTPase of plants

(责任编辑:张志钰)