

蒺藜苜蓿中1个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定

杨倩倩 刘元 陈大松 李友国

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 以模式豆科植物蒺藜苜蓿中1个聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)基因为对象, 对其进行生物信息学分析, 结果显示: 该基因全长4 150 bp, 其编码区1 278 bp, 编码425个氨基酸; 其编码蛋白包括2个与细胞壁主要成分果胶降解有关的保守结构域 PL-6 superfamily 和 Glyco_hydro_28; 该酶蛋白与鹰嘴豆、赤豆等豆科植物中的 PG 蛋白同源关系更近。苜蓿基因表达谱数据库分析和 RT-PCR 检测结果表明, *MtPG* 在根瘤中呈显著增强表达, 在非共生组织如根、叶中表达量很低。此外, 基于该基因3个 Tnt1 转座子插入的目标候选突变体(NF0999、NF5561 和 NF4746)插入位点分析, 得到1个纯合突变体材料 NF4746, 共生表型观察表明, *MtPG* 基因在豆科植物共生固氮的早期侵染过程中发挥重要作用。

关键词 蒺藜苜蓿; 聚半乳糖醛酸酶基因; RT-PCR; 转座子插入突变; 共生表型

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0062-09

高等植物细胞的细胞壁是由不同种类多糖和结构蛋白组成的复杂的结构, 其中多糖包括纤维素、半纤维素和果胶。细胞壁除了能够维持细胞架构, 还能够抵御外来病原菌的侵染^[1]。在双子叶植物中, 果胶占细胞壁干质量的30%~35%, 是细胞壁和胞间层最主要组分之一, 富含不同比例的半乳糖醛酸残基和多达17种中性单糖, 如D-果糖、D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖等, 根据果胶的主链结构、半乳糖醛酸残基连接方式和中性多糖的种类, 可将其分为4种不同的大分子结构区域, 如聚半乳糖醛酸(HGs)、鼠李糖半乳糖醛酸 I (RG I s)、鼠李糖半乳糖醛酸 II (RG II s) 和木糖半乳糖醛酸(XGs), 其中聚半乳糖醛酸约占果胶成分的65%, 被认为是果胶最主要组成成分^[2-4]。HG是一种由 α -1,4糖苷键连接的半乳糖醛酸聚合而成的线性多糖, 能够与RG I s、RG II s 或者细胞壁其他组分的聚合物以共价交联的方式结合, 因其能够增加细胞壁的黏度而被认为是细胞壁的核心结构^[5]。此外, HGs 在高尔基体合成的过程中, 其主链上C-6、O-2 或者 O-3 上连接的半乳糖醛酸残基分别被高度甲基酯化或者乙酰酯化后被分泌出来作为细胞壁主要组分, 半乳糖

醛酸被甲酯化程度不同会形成不同结构的 HGs, 如连续>10个未被甲酯化的半乳糖醛酸可以与Ca²⁺结合而形成稳定的“egg-boxes” HGs 模型^[6]。细胞内存在着许多控制 HGs 甲酯化或者乙酰酯化程度的酶, 参与其结构修饰, 导致 HGs 行使不同的功能, 如果胶乙酰酯酶(PAEs)能够脱乙酰化从而阻碍植物花粉管的延长; 果胶甲基酯酶(PMEs)能够将甲基酯化的 HGs 水解为寡聚半乳糖醛酸的果胶裂解酶类(PLLs)和聚半乳糖醛酸酶(PGs)^[7]。

PGs 作为最主要的 HGs 水解酶, 属于糖基水解酶 28 家族, 普遍存在于植物、食草昆虫和微生物中, 尤其在高等植物生长发育过程中有着非常广泛而重要的作用^[8]。PGs 有 2 种存在形式, 即内生 PGs (EC 3.2.1.15) 和外生 PGs (EC 3.2.1.67), 无论是哪种存在形式, 其作用方式均是通过水解主链和半乳糖醛酸之间的 α -(1-4)键而达到水解 HGs 的目的^[1,9]。在拟南芥中存在多个聚半乳糖醛酸酶基因, *PGX1* 参与细胞的伸长、膨胀和花的生长和发育; *PGX2* 则能够促进拟南芥子叶下胚轴的伸长、叶的扩张、茎的木质化等; *QRT2*、*ADPG1* 和 *ADPG2* 对拟南芥生殖发育过程中花粉粒等不同的细胞分裂

收稿日期: 2017-02-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100702); 国家自然科学基金项目(31670243; 31371549)

杨倩倩, 硕士研究生. 研究方向: 生物固氮与菌植互作. E-mail: yang0641@126.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授. 研究方向: 生物固氮与菌植互作. E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

具有很重要的作用^[10-12]。此外,在水稻中PGs的超表达降低果胶组分和细胞黏着力的同时还增加了对非生物逆境的敏感性^[13];而在苹果中PGs的超表达导致叶片形态发育不正常、果实脱落等表型^[14]。关于该基因在豆科植物中的功能研究却不多。

豆科植物在土壤缺乏氮元素的条件下,会通过根系分泌类黄酮物质吸引根瘤菌并诱导其合成特殊的脂壳几丁寡糖—结瘤因子,当结瘤因子被植物特异性地识别后,根瘤菌被弯曲的根毛捕获进入根毛细胞形成植源性的侵入线,随后根瘤菌通过植源性的侵入线进入植物根内皮层细胞,刺激内皮层分生细胞形成根瘤原基^[15-16]。在根瘤菌侵染早期不仅涉及到复杂的信号传递过程^[17],还需要很多的宿主植物基因参与。例如,在侵入线形成和根瘤菌进入植物内皮层细胞的过程中,植物细胞的细胞壁破裂才能够保障根瘤菌进入植物细胞,而在豆科植物中与早期侵染有关的细胞壁裂解相关基因的研究却很少。

在豆科植物紫花苜蓿中发现PG3与分生组织的形成有关,还参与豆科植物-根瘤菌共生早期的侵染过程中宿主植物根毛细胞壁重排、根瘤菌入侵和侵染线的形成过程^[18]。在豆科模式植物百脉根的研究中发现,果胶裂解酶基因*LjNPL*在根瘤菌早期侵染过程中能够裂解宿主植物的细胞壁,协助根瘤菌进入宿主皮层细胞,对于早期侵染线形成的起始也有很重要的作用^[19]。在模式植物蒺藜苜蓿基因组数据库中,除了具有与*LjNPL*同源的果胶裂解酶基因,还有很多PGs也能够降解果胶,例如*Medtr6g005630*、*Medtr2g032710*、*Medtr5g034090*等。

基于基因表达谱网站(Mt GEA, <https://mt-gea.noble.org/v3/>)中的数据库分析,发现蒺藜苜蓿PG基因*Medtr6g005630*在根瘤和根中均表达,但在根瘤中表达量远高于在根中的表达,这暗示其在共生固氮中具有潜在重要功能。为确定*Medtr6g005630*基因的功能,本研究对该基因的3个Tnt1转座子插入突变体进行PCR筛选鉴定、基因表达和共生表型等分析,旨在揭示该基因在豆科植物早期侵染过程中的作用,同时也为模式植物蒺藜苜蓿早期侵染过程的分子机制研究提供一定的证据。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株、主要试剂和仪器

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) A17 由华中

农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮室保存;蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) R108 来自华中农业大学微生物学国家重点实验室张忠明老师课题组;突变体材料(NF5561、NF4746、NF0999)为英国 John Innes Centre 赠予。苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 1021 和苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*) 2011 均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮室保存。

RNA 抽提试剂 Gateway BP-clonase Trizol reagent, 用到的 *Taq* DNA 聚合酶、反转录酶等酶制剂均为 Fermentas 公司产品;植物基因组 DNA 提取试剂盒购于 TIANGEN 公司;荧光定量试剂盒为 SYBR Green real-time PCR Master Mix, 抗生素链霉素、卡那霉素等购自 Duchefa 公司。PCR 仪为 Bio-Rad 生产, Step one Real-time PCR system 购自 ABI, 气相色谱仪 GC4000A 购自东西仪器。

1.2 蒺藜苜蓿盆栽试验

挑选粒大饱满的蒺藜苜蓿种子,用刀片或 1 mL 注射器针头在种子表面轻轻划出浅浅的划痕,移至 100 mL 无菌 PA 瓶中,再加入 2% 次氯酸钠溶液(稀释 5 倍,注意先加入无菌水,再加入 10% 次氯酸钠),表面消毒 2~5 min,种子划痕处出现褐色破损,弃废液,无菌水冲洗种子至 PA 瓶中液体变淡或无色。最后留部分水浸没种子。将种子放入 4 °C 冰箱,低温黑暗处理 24~48 h。将吸胀的种子移入 FM 平板中,于 28 °C 倒置暗培养 12~24 h,直至种子长出 0.5~1.5 cm 胚轴和胚根。将已发芽的种子移植入灭菌盆中进行沙培,灭菌培养箱(16 h 光照 22 °C, 8 h 黑暗 18 °C)中进行培养,第 1 片真叶展开后接种苜蓿中华根瘤菌。

1.3 蒺藜苜蓿组织材料收获及 RNA 抽提

取生长 3、5、7、15 d 植株,冲洗干净,收集相应的根、叶、瘤等组织,于 -80 °C 冻存备用。

将收集的植物组织放于研钵中,加入液氮研磨,按 100 mg/mL 加入 Trizol 试剂,待其完全融化澄清后于 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清于一支新 EP 管中,加入 0.2 mL 氯仿充分混匀后 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min;取上清于另一支新 EP 管中,加入等体积的异丙醇冰上静置 10 min 后 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 1 mL 75% 乙醇洗涤,振荡混匀,4 °C 12 000 r/min 并加入 DNaseI 处理后置于 -80 °C 冻存备用^[20]。

1.4 实时荧光定量 PCR

分别收取蒺藜苜蓿接种苜蓿根瘤菌后 3、5、7 d 的根、15 d 的根瘤和去瘤的根、叶。反转录得到 cDNA,进行荧光定量 PCR,比较基因表达量用普通 PCR 方法检测引物(扩增应得到单一、明亮的条带);用 DEPC 稀释以调整各样品浓度,并用实时荧光定量 PCR 方法检测目的基因的表达;按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 说明书配制 Real-time PCR 反应体系,反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s;59 °C 20 s,72 °C 20 s,40 个循环。上游引物:5'-CACTTGTGTCAGT-GTTTGGCATCG-3',下游引物:5'-CCCCAACA-CAATGAATTGGAAATC-3'。

1.5 蒺藜苜蓿基因组 DNA 的抽提

按照 TIANGEN 公司基因组 DNA 的抽提试剂盒说明书进行抽提。

取蒺藜苜蓿植株新鲜组织约 100 mg,加入液氮充分碾磨,迅速转移到装有 700 μL 65 °C 预热缓冲液 GP1 的离心管中(含 0.1% 巯基乙醇),混匀后,

65 °C 水浴 20 min,期间混匀样品数次。加入 700 μL 氯仿,充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min。取上层水相转入一个新的离心管中,加入 700 μL 缓冲液 GP2,混匀,转入吸附柱 CB3 中,12 000 r/min 离心 30 s,弃掉废液。向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液 GD,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液 PW,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。重复上一步。

将吸附柱 CB3 放回收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,倒掉废液。将 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干残余的漂洗液。将 CB3 转入一个干净的离心管中,滴加 50~200 μL 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2~5 min,12 000 r/min 离心 2 min,将溶液收集到离心管中。

1.6 引物设计及突变体筛选

得到各个突变体材料基因组 DNA 后,利用 PCR 对 *Mt PG* 基因 *Tnt1* 转座子插入突变体进行筛选。所设计的引物见表 1。

表 1 筛选突变体的引物设计

Table 1 Primers designed for the mutants screening and identification

名称 Names	引物 Primers	长度/bp Length
PG 1	F 5'GAAGTGATGGTGTAAGTGTGAGTGG3' R 5'GAACTCGCATCTCCGACCAA 3'	744
PG 2	F 5'ATTGGTCGGAGATGCGAGTTC3' R 5'TGCCGATGCCAAACTGA 3'	745
NF0999	F 5'TGGATGAATGAGACTGGAGGG 3' R 5'TGCCGATGCCAAACTGA 3'	924
NF5561	F 5'AGTCACTTGCTCGTCTTGGACAC 3' R 5'AGACACACAATCATCCCTACATG 3'	824
NF4746	F 5'TGGATGAATGAGACTGGAGGG 3' R 5'TGCCGATGCCAAACTGA 3'	887

将突变体材料种子灭菌后放置于平板上萌发,发芽后置于光照培养室进行无菌沙培,其中 NF5561 9 颗,NF0999 5 颗,NF4746 9 颗。

待植株第 1 片真叶展开后,接种苜蓿中华根瘤菌 SM2011,观察其接种后 30 d 植株共生表型。同时收取各突变体植株叶片,抽提其基因组 DNA,利用 PCR 进行纯合突变体的筛选。

若目的基因能够扩增出来(PG-F、PG-R),插入的下游片段(Mut-F、PG-R)未扩增出来,则说明为野生型植株;若前者未扩增出目的条带而后者扩增出产物,则说明为纯合突变植株;若两者均扩增出目

的条带则说明为杂合突变植株。在 NF5561 和 NF0999 植株中,目的基因均扩增出来,插入位点下游均未扩增出目的条带,说明它们均是野生型植株。

1.7 根瘤固氮酶活测定

取 6 个 20 mL 的 PA 瓶,用医药葡萄糖瓶的橡胶塞密封。用微量进样器分别加入 5、10、20、30、40、60 μL 标准乙炔气体。调试好气相色谱仪后,用微量进样器从每个瓶中抽 100 μL 气体注入气相色谱仪的进样室,记录乙炔峰面积,制作标准曲线。将适量的根瘤或新鲜的样品根部放入小玻璃瓶中,用橡胶塞密封瓶口,先用注射器从瓶中抽出 1/10 体积

的气体,再注入1/10体积的乙炔气体作为固氮酶底物,密封后置于28℃培养箱反应2h,反应完毕后用微量取样器抽取玻璃瓶内气体100 μL用气相色谱仪检测乙烯吸收峰值,根据相同条件下制备的标准曲线折算乙烯体积并计算固氮酶^[21]。

2 结果与分析

2.1 MtPG 基因序列和编码蛋白的结构域分析

从NCBI及phytozom v 11.0(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中查询得知,MtPG(Medtr6g005630)基因全长4 150 bp,其中编码区1 278 bp,编码425个氨基酸。同时在NCBI上分析MtPG基因编码蛋白质的结构域,结果显示:MtPG基因氨基酸序列包含多个结构域,其中包括PL-6 superfamily和Glyco_hydro_28(GH28; Pfam00295)2个保守结构域。其中PL-6 superfamily为多糖裂解酶家族,包括褐藻胶裂解酶等,这些

酶主要水解β-1,4糖苷键和糖醛酸;而Glyco_hydro_28为糖基水解酶家族,该家族中包括鼠李糖半乳糖醛酸酶等,这些酶对细胞壁的降解和重塑非常重要。

2.2 MtPG 的同源性比对和系统发育分析

将MtPG编码的氨基酸序列在NCBI中进行BLAST比对分析,将搜索得到的该基因在不同物种中的同源蛋白构建了系统发育进化树(图1),结果显示,PG基因在豆科植物及其他高等植物中普遍存在。值得注意的是,豆科植物的PG基因在进化树中构成一个独立的进化枝,且MtPG基因与鹰嘴豆、赤豆等中的PG基因同源关系更近。这表明PG基因可能与豆科植物共生固氮功能关系密切。

进一步选取MtPG与几种亲缘关系较近的豆科植物同源蛋白进行氨基酸序列比对,结果表明,MtPG与鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)中PG的氨基酸序列同源性最高。

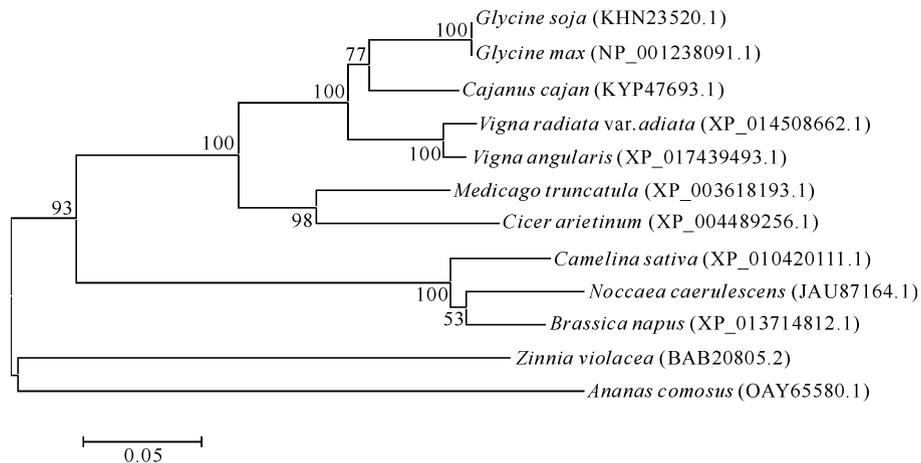


图1 MtPG 的系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of the MtPG protein

2.3 MtPG 的共生表达特征分析

基因表达谱网站中的数据分析(Mt GEA)显示,MtPG在根瘤和根中均表达,但是在根瘤中表达量远高于在根中表达。为了验证这一结果,抽提了接种和未接种根瘤菌植株的不同时间、不同组织的RNA,通过RT-PCR检测MtPG的表达水平。结果表明,在接种根瘤菌的第3天MtPG表达量最高,到第5天、第7天表达量很低,几乎不表达(图2A),在未接菌的根中均没有表达,这暗示MtPG功能与早期共生过程有关。在接种根瘤菌15d植株各组织中,根瘤中表达量最高,在接种根瘤菌植

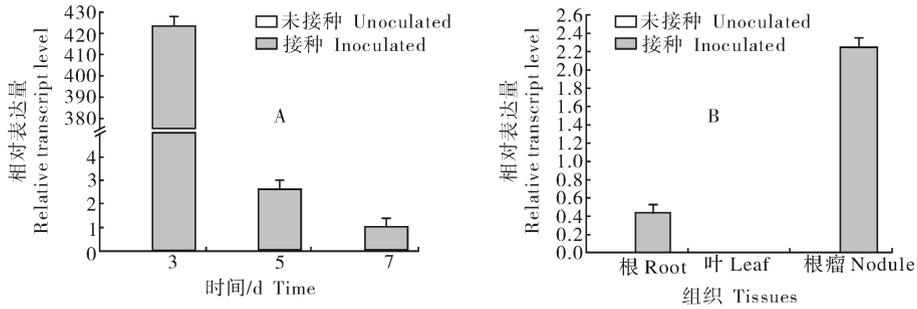
株的根中仅有少量表达,而在未接种根瘤菌植株的根和叶中均未表达(图2B),这进一步说明MtPG可能在共生固氮早期中发挥功能。

2.4 MtPG Tnt1 插入突变体的确定及筛选引物设计

为了研究MtPG在蒺藜苜蓿-苜蓿根瘤菌共生过程中的生物学功能,用MtPG在Nobel Foundation Tnt1突变体库(<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>)中查询、比对,发现3个该基因的Tnt1插入突变体NF5561、NF0999和NF4746。突变体NF5561是转座子Tnt1反向插入在该基因全

长第 4 个外显子内,而 NF0999 和 NF4746 均为转座子 *Tnt1* 插入到该基因最后一个外显子内(图 3)。

根据插入位点设计 5 对引物(表 1),其中包括 2 对目的基因引物 PG1(F,R)和 PG2(F,R)(图 4)。



A. *MtPG* 在接菌和不接菌蒺藜苜蓿根中的表达量; B. *MtPG* 在接菌和不接菌蒺藜苜蓿根、叶、瘤中的表达量 A. Transcript levels of *MtPG* in roots and nodules with or without SM1021 inoculation in *M. truncatula*; B. Transcript levels of *MtPG* in leaves, roots, and nodules at 22 dpi with or without SM1021 inoculation in *M. truncatula*.

图 2 *MtPG* 的表达分析
Fig.2 Expression assay of *MtPG*

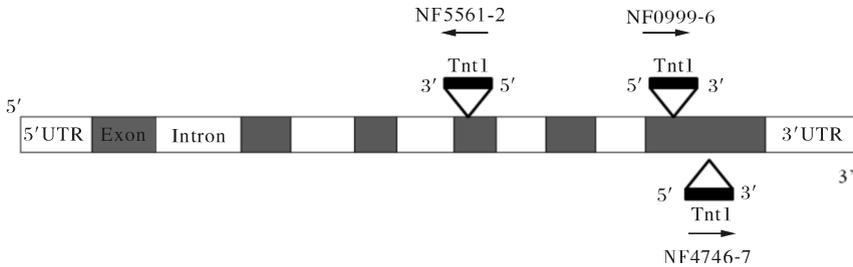


图 3 3 个突变体在 *MtPG* 基因组 DNA 上的插入位点

Fig.3 *Tnt1* insertions of 3 mutants in *MtPG*

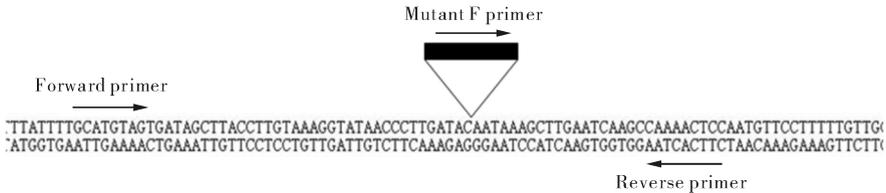


图 4 突变体筛选引物设计示意图

Fig.4 Demonstration of PCR primers designed for screening the mutants

2.5 目标突变体的筛选和验证

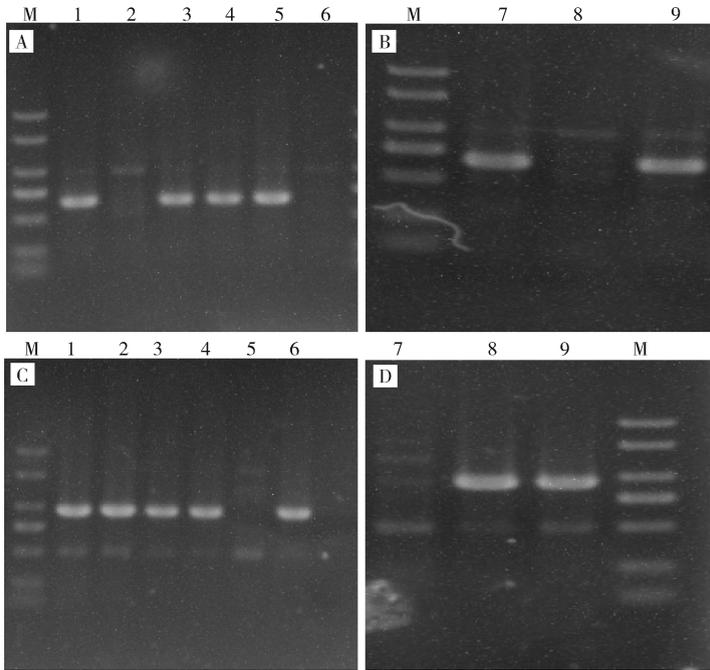
在 NF4746 植株中,1、3、4、7、9 号植株目的基因和插入位点下游均有目的条带被鉴定为 *Tnt1* 插入杂合体(图 5);5 号植株均扩增出目的基因,插入位点下游均无目的条带,为野生型;2、6、8 号植株目的基因未扩增出来,插入位点下游均有目的条带,为 *Tnt1* 插入纯合体(图 5)。

2.6 *MtPG* 纯合突变体 NF4746 的共生表型检测

为了鉴定 *MtPG* 在共生固氮中的作用,将筛选获得的 *MtPG* 纯合突变体种子 NF4746 进行盆栽试

验。将 NF4746 突变体种子和对照植株野生型 R108 种子经过灭菌处理后,进行无菌沙培,当第 1 片真叶展开时接种苜蓿中华根瘤菌 SM2011,收取接种 30 d 的植株进行表型观察与检测。

与野生型植株相比,NF4746 突变体植株地上部分长势无明显差异(图 6)。对植株地上部分鲜质量及植株根瘤数量进行统计分析,发现突变体植株地上部分鲜质量比对照略低(图 7A),但没有达到显著性差异($n = 9$),突变体植株根瘤数量增多(图 7B),也未达到显著性差异($n = 9$)。



M:DL2000,1~9:NF4746 突变体种子编号; A 和 B 显示目的基因扩增结果,C 和 D 显示为 NF4746-F 和插入位点下游引物 NF4746-R 扩增结果。M:DL2000,1-9; Number of NF4746 seeds. A and B indicate identification of *MtPG* gene,C and D indicate identification of mutants.

图5 NF4746 突变体筛选

Fig.5 Identification of NF4746

但是观察发现,突变体植株所结根瘤比野生型所结的红色瘤颜色淡,为浅褐色。进一步利用乙炔还原法测定突变体植株所结根瘤的固氮酶活性,结果显示突变体根瘤的固氮酶活显著降低($P < 0.05$, $n = 3$)(图 7C)。

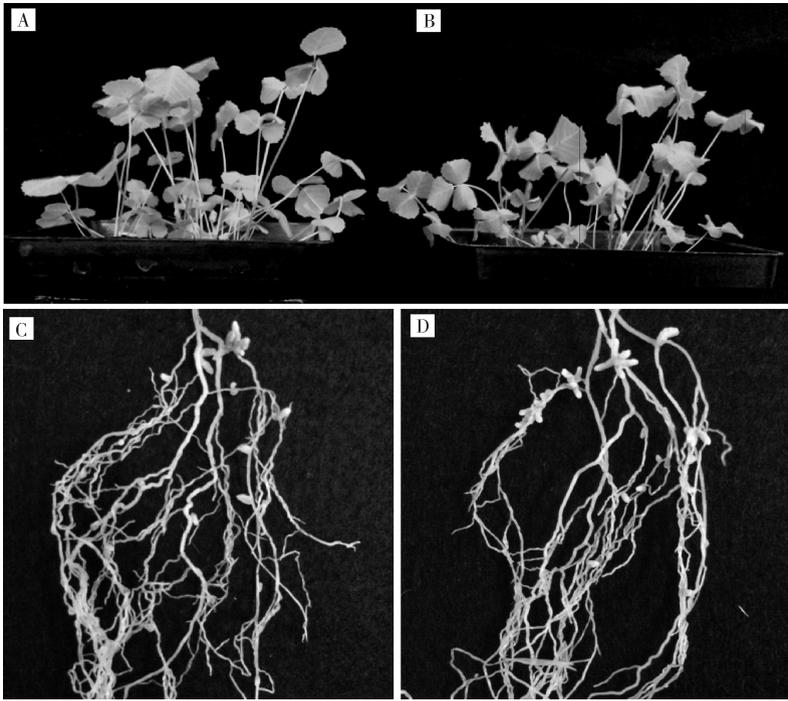
3 讨论

在豆科植物与根瘤菌共生固氮的早期,根瘤菌释放的结瘤因子被植物特异性地识别,根毛弯曲并捕获周围根瘤菌开始进入根毛细胞,形成侵入线,随后根瘤菌通过植源性的侵入线进入根内皮层,刺激皮层细胞分裂,形成根瘤原基然后进一步发育成根瘤行使固氮功能^[22]。此过程中根瘤菌需在细胞壁裂解时才能进入植物细胞,在豆科植物紫花苜蓿中 *PG3* 和百脉根中的 *LjNPL* 均和细胞壁裂解相关,且参与豆科植物共生固氮早期根瘤菌入侵和侵染线形成等过程^[18-19]。

HGs 作为细胞壁的主要成分,其功能伴随着结构的改变而不同,而 HGs 的改变,如甲酯化、乙酰化以及聚合的程度主要依赖于一些特殊的酶类,即 HGMEs (HG-modifying enzymes),其中包括

PAEs、PMEs、PLLs 和 PGs^[23]。PGs 作为 HGs 的主要水解酶,在植物生长发育过程中有着广泛的功能,比如参与细胞的伸长、膨胀及分裂等^[25]。

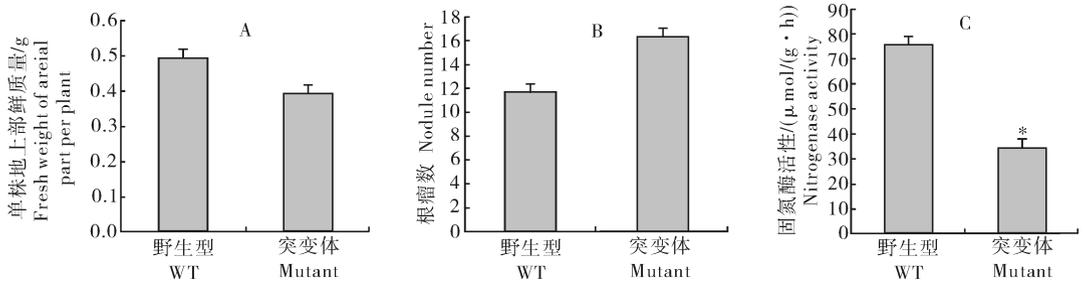
本研究通过对蒺藜苜蓿的 PGs 系统发育分析发现,与 *MtPG* 同源关系更近的均为豆科植物(鹰嘴豆、赤豆、大豆等)中的 PG,这说明该基因可能与豆科植物某些特殊过程有关,例如共生固氮。苜蓿基因表达谱分析结果显示,*MtPG* 基因在苜蓿根、茎、叶中表达量极低,在根瘤中表达量较高,且在根瘤分生区和侵染区表达量更高,这一结果暗示 *MtPG* 基因可能与共生固氮早期过程密切相关。为了证实这个推测,本研究利用 RT-PCR 对该基因进行时空表达和特异性表达分析,结果表明:该基因确实在根瘤菌接种根中表达量相对较高,这表明该基因可能参与共生固氮早期侵染过程。对其进行结构域分析,发现 *MtPG* 基因氨基酸序列包括 PL-6 superfamily (cl19188; Polysaccharide Lyase Family 6) 和 Glyco_hydro_28(GH28; Pfam00295) 2 个保守结构域,其中 PL-6 superfamily 为多糖裂解酶家族,包括褐藻胶(2 种糖醛酸通过 1,4 糖苷键结合在一起)裂解酶和软骨素酶,这些酶主要水解 β -1,4-糖苷键和糖



A.野生型 R108 植株地上部分表型; B.突变体 NF4746 植株地上部分表型; C.野生型 R108 植株地下部分表型; D.突变体 NF4746 植株地下部分表型。A.Aerial part of wild type R108; B.Aerial part of NF4746; C.Underground part of wild type R108; D.Underground part of NF4746.

图6 突变体 NF4746 的共生表型观察

Fig.6 Symbiotic phenotype of NF4746



A.突变体 NF4746 植株地上部分鲜质量; B.突变体 NF4746 植株根瘤数量; C.突变体 NF4746 所结根瘤的固氮酶活性测定。A.Fresh weight of aerial part between WT and NF4746; B.Nodule number of WT and NF4746; C.Identification of nitrogenase activity between WT and NF4746.

图7 突变体 NF4746 共生表型测定

Fig.7 Symbiotic phenotype of mutant NF4746

醛酸^[25];Glyco_hydro_28 为糖基水解酶家族,包括鼠李糖半乳糖醛酸酶、聚半乳糖醛酸酶等,这些酶对细胞壁的降解是必需的^[26]。而在共生固氮早期,根瘤菌需要在细胞壁裂解时才能进入植物细胞内,进而形成侵染线,进一步揭示 *MtPG* 可能参与苜蓿共生固氮早期,且可能跟早期根瘤菌侵染过程中细胞壁裂解有关。

本研究筛选得到了该基因纯合 *Tnt 1* 插入突变

体 NF4746,并进行了表型验证。表型观察和分析结果显示,与野生型植株相比,NF4746 突变体根瘤颜色较浅,固氮酶活显著性降低。一方面是因为突变体早期侵染过程的破坏,导致含菌细胞的减少进而影响后期根瘤的表型;另外,可能因为 NF4746 突变体 *Tnt 1* 插入位点并没有在其保守结构域的活性位点,而使半乳糖醛酸酶功能部分丧失,从而使植株共生固氮能力部分减弱;此外,由于 *PGs* 基因属于

一个大细胞壁裂解酶基因家族, *PG* 突变体功能的缺失可能会被其他基因功能弥补^[3], 所以在NF4746突变体中植株地上部分鲜质量和结瘤数量均未达到显著差异。

对 *MtPG* 基因 *Tnt1* 插入突变体的筛选及共生表型的观察分析表明: *MtPG* 基因确实影响了宿主植物的共生固氮作用。但是, *MtPG* 基因在蒺藜苜蓿-根瘤菌共生互作中的功能机制需要进一步的研究和证据。

参 考 文 献

- [1] JUGE N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes[J]. Trends in plant science, 2006, 11(7): 359-367.
- [2] BONNIN E, DOLO E, GOFF A. Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes[J]. Carbohydrate research, 2002, 337: 1687-1696.
- [3] PELLOUX J, RUSTERUCCI C, MELLEROWICZ E J. New insights into pectin methyltransferase structure and function[J]. Trends in plant science, 2007, 12(6): 267-277.
- [4] JEONG H Y, NGUYEN H P, LEE C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of rice pectin methyltransferases: implication of functional roles of pectin modification in rice physiology[J]. Journal of plant physiology, 2015, 183: 23-29.
- [5] CAFFALL K H, MOHNEN D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides[J]. Carbohydr Res, 2009, 344(14): 1879-1900.
- [6] BASAK R, BANDYOPADHYAY R. Formation and rupture of Ca⁽²⁺⁾ induced pectin biopolymer gels[J]. Soft matter, 2014, 10(37): 7225-7233.
- [7] HOCQ L, PELLOUX J, LEFEBVRE V, et al. Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth[J]. Trends in plant science, 2017, 22(1): 20-29.
- [8] VERLENT I, SMOUT C, DUVETTER T, et al. Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification[J]. Innovative food science & emerging technologies, 2005, 6(3): 293-303.
- [9] PROTSSENKO M A, BUZA N L, KRINITSYNA A A, et al. Polygalacturonase-inhibiting protein is a structural component of plant cell wall[J]. Biochemistry (Moscow), 2008, 73(10): 1053.
- [10] XIAO C, SOMERVILLEO C, ANDERSON C T. Polygalacturonase involved in expansion1 functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2014, 26(3): 1018-1035.
- [11] OGAWA M, KAY P, WILSON S, et al. *Arabidopsis* dehiscence zone polygalacturonase1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2009, 21(1): 216-233.
- [12] XIAO C, BAMS W J, ZAMIL M S. Activation tagging of *Arabidopsis* polygalacturonase involved in expansion 2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging[J]. The plant journal: for cell and molecular biology, 2017, 89: 1159-1173.
- [13] LIU H, MA Y, CHEN N, et al. Overexpression of stress-inducible OsBURP16, the beta subunit of polygalacturonase 1, decreases pectin content and cell adhesion and increases abiotic stress sensitivity in rice[J]. Plant, cell & environment, 2014, 37(5): 1144-1158.
- [14] ATKINSON R G, SCHRODER R, HALLETT I C, et al. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion[J]. Plant physiology, 2002, 129(1): 122-133.
- [15] MURRAY J D. Invasion by invitation: rhizobial infection in *Legumes*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24: 631-639.
- [16] HANEY C H, LONG S R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(1): 478-483.
- [17] 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.
- [18] MUNOZ J A, CORONADO C, PEREZ-HORMAECHW A. *MSPG3*, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction [J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 9687-9692.
- [19] XIE F, MURRAY J D, KIM J, et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(2): 633-638.
- [20] 李振鹏, 马春草, 李友国, 等. 华葵中慢生根瘤菌 7653RSraGsRNA 的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 51-57.
- [21] 路达, 彭杰丽, 李友国, 等. 华葵中慢生根瘤菌 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.
- [22] JONES K M, KOBAYASHI H, DAVIES B W. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model [J]. Nature reviews microbiology, 2007, 5(8): 619-633.
- [23] SENECHAL F, WATTIER C, RUSTERUCCI C, et al. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants[J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(18): 5125-5160.
- [24] SANDER L, CHILD R, ULVSKOV P. Analysis of a dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*: evidence for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and in stylar tissues during pollen tube growth[J]. Plant molecular biology, 2001, 46: 469-479.

[25] MICHEL G, POJASEK K, LI Y, et al. The structure of chondroitin B lyase complexed with glycosaminoglycan oligosaccharides unravels a calcium-dependent catalytic machinery[J]. The journal of biological chemistry, 2004, 279(31): 32882-32896.

[26] PETERSEN T, KAUPPINEN S, LARSEN S, et al. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel helix[J]. Structure, 1997, 5: 533-544.

Screening and identifying polygalacturonase gene mutant in *Medicago truncatula*

YANG Qianqian LIU Yuan CHEN Dasong LI Youguo

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

Abstract The polygalacturonase (PG) gene in *Medicago truncatula* was analyzed with bioinformatics. Results showed that the length of the gene was 4 150 bp with 1 278 bp coding region encoding 425 amino acids. The protein encoded contains two conserved domains, PL-6 superfamily and Glyco_hydro_28, which are related to degradation of cell wall pectin. The homology between PG in *Medicago truncatula* and PG in some other leguminous plants including chickpeas and red bean was close. Results of gene expression profile and RT-PCR detection showed that MtPG expression was significantly enhanced in the root nodules but very low in non-symbiotic tissues including roots and leaves. Three Tnt1 transposons insertion mutants (NF0999, NF5561 and NF4746) were screened by PCR and one homozygous mutant NF4746 was obtained. It is indicated that the *MtPG* gene may play an important role in the early infection of symbiotic nitrogen fixation in legumes.

Keywords *Medicago truncatula*; polygalacturonase gene; RT-PCR; transposons insertion mutants; symbiotic phenotype

(责任编辑:张志钰)