

参与紫云英共生固氮的一个上调表达结瘤素基因 的分离与鉴定

吴梅 丑敏霞 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 基于接种华葵中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 的紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 感染根与未接种对照根在转录水平上的差异, 利用抑制差减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH), 建立了紫云英结瘤固氮过程中的差异表达 cDNA 文库, 共获得 527 个有效克隆, 其中增强或特异性表达的上调文库中包含 341 个克隆, 抑制表达的下调文库包含 186 个克隆。对其中的 1 个上调表达 cDNA 克隆 *AsB6* 利用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方法获得了其基因全长序列, 利用 BLAST 在线软件和 GenBank, GenBank EST 和 Tigr Porcine EST 等数据库进行同源序列比较, 表明 *AsB6* 与苜蓿的 γ -酮酯酰合成酶及依赖于 SAM (S-adenosylmethionine, S-腺苷蛋氨酸) 的羧甲基转移酶具有 66% 的同源性, 同时利用实时荧光定量 PCR 研究了该基因的时空表达特征。结果显示, 接种根瘤菌 7653R 后, 在紫云英感染根和根瘤中该基因的表达量显著增强, 且在接种后根瘤形成早期和固氮中晚期表达量相对较高。推测其可能与根瘤菌前期感染和根瘤形成、根瘤代谢功能有关。

关键词 抑制差减杂交; 紫云英; 上调基因; γ -酮酯酰合成酶; 共生固氮

中图分类号 S 154.38⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0169-06

紫云英 (*Astragalus sinicus*) 是生长于中国、韩国和日本的一种豆科绿肥, 多种植于稻田中, 用于提高土壤肥力。华葵中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 可以和紫云英共生固氮, 互作形成不定型根瘤。它和紫云英的共生体系是中国特有的优势共生固氮资源。华葵中慢生根瘤菌具有很强的宿主专一性, 决定了它和紫云英的共生体系是研究根瘤菌与宿主植物共生固氮机理的好材料, 尤其是在研究根瘤菌和宿主植物之间共生固氮信号的传导和相互作用方面, 该体系具有重大的研究价值^[1-4]。

但是目前对于紫云英参与共生固氮的功能基因研究报道较少。共生固氮包括早期和晚期 2 个过程, 大量的根瘤菌和植物双方基因参与其中。早期共生基因调控根瘤菌侵染、侵入线形成以及根瘤形成等过程, 晚期共生基因调控着类菌体的分化、根瘤固氮及衰老, 从而调控共生固氮的全局过程。然而目前大部分研究都集中在共生早期双方的分子对话

方面^[5-6], 晚期的研究相对较少, 人们对于共生固氮晚期分子机理的认识还远远不够。

本研究利用 SSH 技术比较了紫云英感染根和未接种对照根的基因转录情况, 建立了其感染根及未接种对照根的差异表达 cDNA 文库, 以期对紫云英参与共生结瘤固氮过程中的功能基因进行系统的鉴定, 从而分离获得新的结瘤固氮相关宿主功能基因和更多有用的分子探针。在前期研究中, 作者所在实验室报道了紫云英 13 个根瘤特异性或增强表达的基因^[7-8]。这些基因所编码的多肽主要包括 Usp 家族 (universal stress protein family, Usp) 类似物、半胱氨酸蛋白家族 (cysteine cluster proteins, CCP) 同源物和脂类转运蛋白家族 (lipid transfer protein, LTP) 类似物。

本文则报道另外 1 个在紫云英共生固氮过程中的上调表达基因 *AsB6* 的克隆鉴定及其表达特征, 并结合序列查询及结构域分析讨论了它的功能。

收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-11-12

* 国家“973”计划课题 (2010CB126502) 和华中农业大学人才启动基金 (2005XRC026) 资助

** 通讯作者。E-mail: liyouguo2001@yahoo.com.cn

吴梅, 女, 1984 年生, 硕士研究生。研究方向: 根瘤菌共生固氮体系分子机理。E-mail: wumei.nono@yahoo.com.cn

材料与方法

材料

将紫云英种子浸入 95% 的乙醇 5 min, 再以 5% NaClO 表面消毒 5 min, 无菌水洗涤 6~8 次, 黑暗中于室温下发芽 2 d。将发芽的种子无菌条件下浅播于灭菌砂钵中, 浇灌 Fahraeus 无氮营养液^[9], 按照 16 h 光照/8 h 暗期于 18~22 ℃ 培养 6 d 后, 接种华癸中慢生根瘤菌 (*M. huakuii*) 7653R。

总提取

用 Trizol 试剂 (Invitrogen, CA, USA) 提取, 具体操作按说明书进行。分别提取紫云英接种根瘤菌 7653R 后 21~26 d 的感染根、根瘤及相应苗龄未接种对照根的 RNA, 进行 SSH 分析。提取紫云英接种后 6、9、12、15、18、21、25、30 d 的感染根, 紫云英接种后 26 d 的去瘤根、根瘤、叶子、茎, 相应苗龄未接种根的 RNA, 进行实时荧光定量 PCR 分析。

合成

利用 ClonTech SMART PCR cDNA Synthesis kit (ClonTech, CA, USA) 进行 cDNA 的合成与扩增, 操作按试剂盒说明书进行, 略作如下改动: 取 1 μg 纯化后的总 RNA, 加入 cDNA 合成 (CDS) 引物及 SMART 寡聚核苷酸, 42 ℃ 温育 1 h, 合成第 1 链 cDNA。随后, 向 10 μL 第 1 链反应体系中加入 40 μL Tricine-EDTA 缓冲液, 72 ℃ 温育 7 min。取 1 μL 上述稀释后的单链 cDNA 为模板进行长距离 (LD) PCR。反应体系为 100 μL。反应程序为: 95 ℃ 15 s, 65 ℃ 30 s, 68 ℃ 6 min, 共 17 个循环。于 PTC-100TM Peltier Thermal Cycler (MJ Research TMI, Inc., Massachusetts, USA) 上进行扩增。

和差减 文库构建

利用 ClonTech PCR-Select cDNA Subtraction kit 进行文库的构建。简言之, 获取总 RNA 之后, 以链霉素亲和磁珠法分离 poly(A) RNA (PolyA Tract mRNA Isolation System, Promega, USA), 分别以 2 μg 紫云英接种后 21~26 d 的根及相应苗龄未接种根中的 poly(A) RNA 为模板合成 cDNA, 随后用限制性内切酶 *Rsa* 酶切消化。酶切后的 cDNA 片段作为 Tester 和 Driver 进行正向和反向杂交。正向杂交中, 以来自接种根的 cDNA 片段为 Tester 进行目的基因的筛选, 反向杂交中, 则来自未接种根的 cDNA 片段为 Tester, 去除那些非特异性表达的基因。Tester cDNA 两端分别

连接 2 个不同的接头, 该接头含有与 PCR 引物配对的序列及克隆位点, Driver cDNA 不加接头。将 Tester cDNA 分为 2 份, 变性, 分别与变性后的 Driver cDNA 差减杂交。紧接着进行第 2 次杂交, 亦即差减后的 2 份 Tester cDNA 之间的杂交。最后, 扩增 Tester cDNA 中特异表达的 cDNA 片段, 并克隆到 pGEM-T 载体 (Promega) 上。

目标基因测序及 获取基因全长

将上调表达 cDNA 克隆 *AsB6* 插入片段送交 Invitrogen 公司测序。将测序结果利用 BLAST 在线软件与 GenBank, GenBank EST 和 Tigr Porcine EST 等数据库进行同源序列比较。利用 3-Full RACE Core Set Ver. 2.0、5-Full RACE Kit (TaKaRa) 和基因特异性引物 (GSP) 扩增目的基因的 5' 及 3'-cDNA 末端; 全长 cDNA 的克隆通过 5' 及 3'-RACE 产物重叠部分的拼接获得。全长 cDNA 随后与 pGEM-T 载体 (Promega) 相连。5'-cDNA 末端扩增引物为 GSP 1:5-CAATACCATCA-CACCACCTCCACAAAGT-3' 和 GSP 2:5-TC-CCTTGTTTGTGGTCTGCTTCT-3'; 3'-cDNA 末端扩增引物为 GSP 1:5-GGTTGCTCTTCA-GACCAAATGCT-3' 和 GSP 2:5-CAAGT-TACTCCCTGATTTCCACC-3'。

序列分析和统计分析

目的基因的氨基酸序列推测利用 BioEdit 软件进行^[10]。同源搜索利用 Blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行, 理论上的等电点 (pI) 和分子质量通过 Compute pI/MW 软件预测 (<http://ca.expasy.org/tools/>)。通过对 InterPro-Scan (<http://www.ebi.ac.uk/>)、Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/>) 和 PROSITE (<http://www.predictprotein.org/>) 数据库的查询, 证实氨基酸保守结构域。SignalP 3.0 Server 软件预测信号肽的存在及其可能的切割位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)。二级结构分析通过 PSIPREDView 程序^[11]进行。

实时荧光定量 分析

利用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 进行实时荧光定量 PCR。利用 oligo-dT 为引物反转录得到 cDNA, 18S rRNA 基因 (GenBank AF3595597) 作为内参, 在 Bio-Rad Mini Opticon 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 反应。每个反应重复 3 次。具体操作程序为: 95 ℃ 预

变性 30 s,接着做 40 个循环,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s。PCR 反应引物为:5'-GAAAA GTCAATACCATCACACCACC-3' 和 5'-AGGACCAAATGCTCTTATGCCTATC-3'。

结果与分析

的制备和质量检测

制备高质量的 mRNA 是保证获得 cDNA 高产量的前提。从接种了根瘤菌 7653R 的紫云英感染根和未接种对照根中分别提取了 mRNA,紫外分光检测结果显示,其质量浓度分别为 0.287 和 0.350 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;纯度 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 分别为 1.98 和 1.92。在 2% 琼脂糖凝胶电泳中还可看出,28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 条带的 1.5~2 倍(图 1)。以上数据和结果表明本研究的有关制备程序可保障获得高质量的 mRNA 样品,其质量完全可满足进行差减杂交的技术要求。

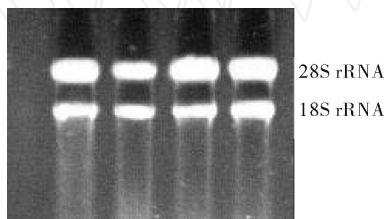


图 1 紫云英感染根组织总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Total RNA isolated from infected roots of *Astragalus sinicus* L.

差减文库的构建和序列分析

利用抑制差减杂交技术,建立了紫云英结瘤固氮过程中的差异表达 cDNA 文库,共获得 527 个有效克隆,其中增强或特异性表达的上调文库中包含 341 个克隆,抑制表达的下调文库中包含 186 个克隆。利用斑点杂交技术,对于上调表达文库中的 341 阳性克隆进行了再次确证筛选。与未接种根相比,选择那些在接种根中的表达强度明显提高(至少 3 倍)的克隆进行测序与生物信息分析,结果得到了 57 个不同的 cDNA 克隆(另文发表)。57 个 cDNA 克隆的测序结果表明,17 个片段与豆血红蛋白基因(*Lb*)有着很高的同源性;3 个片段分别编码紫云英天冬酰胺合成酶基因 *AsA S1*、*AsA S2*;7 个片段分别与早期结瘤素基因 *ENOD2*、晚期结瘤素基因 *nodulin26* 以及来自田菁(*Sesbania rostrata*)的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因、羽扇豆(*Lupinus luteus*)的二磷酸核苷酸磷酸酶 1 基因、推测的辣椒(*Capsi-*

cum annuum) 半胱氨酸蛋白酶基因、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 的 RNA 螺旋酶以及苜蓿(*Medicago truncatula*) 的一个 BAC 克隆 mth2-10i23 表现出或多或少的相似性;另外,有 30 个片段没有找到同源基因。

差减文库消减效率的检测

用看家基因泛素(ubiquitin)半定量 PCR 做消减效率的分析。引物序列为:上游 5'-ATGCAGATCTTTTGTGAAAGAC-3',下游 5'-ACCACACGGAA GACGGAG3';反应程序:94 °C 4 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,循环数为 18~33 个。吸取 5 μL PCR 产物进行电泳鉴定。与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中泛素基因产物大大减少,扩增滞后于消减前约 5~10 个循环,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(结果未显示)。

目的基因的克隆和序列分析

针对增强或特异性表达的上调文库中的 341 个克隆,通过半定量 RT-PCR 方法,证实获得了 1 个在感染根(瘤)中显著增强表达的 cDNA 克隆。利用 5'-及 3'-RACE 方法,获得了其基因全长 cDNA 序列,命名为 *AsB6*。其 GenBank ID 登录号为 FJ784756。*AsB6* 基因克隆原始插入片段大小为 644 bp,通过 RACE 获得其 cDNA 全长为 1 250 bp。依据其开放阅读框推定的基因转录翻译产物(图 2)可以看出,基因 *AsB6* 编码的蛋白含有 266 个氨基酸。进一步的预测显示其分子质量为 30 ku,等电点(pI)为 5.11。BlastP 同源搜索表明,*AsB6* 与苜蓿的 γ -酮酯酰合成酶及依赖于 SAM 的羧甲基转移酶具有同源性,相似度 66%,*E* 值为 $4e-112$ 。InterPro-Scan 分析表明 *AsB6* 确实具有 酮酯酰合成酶及依赖于 SAM 的羧甲基转移酶 2 个功能结构域。

基因的时空表达特征分析

为了定量分析目标基因的表达水平和特征,从一套与 SSH 同样生长条件下栽培紫云英的接种根瘤菌感染根和未接种对照根中分别提取总 RNA,在完成基因组 DNA 的去除与纯度检测后,进行荧光定量 PCR 分析。*AsB6* 在植物不同生长时期、不同器官中 mRNA 的相对积累动态如图 3 所示。由图 3-a 可见,*AsB6* 在接种根瘤菌后 6 d 表达有 1 个高峰,随后几乎不表达,到接种根瘤菌后 21 d 又开始表达。由图 3-b 可见,在接种根瘤菌的紫云英叶片

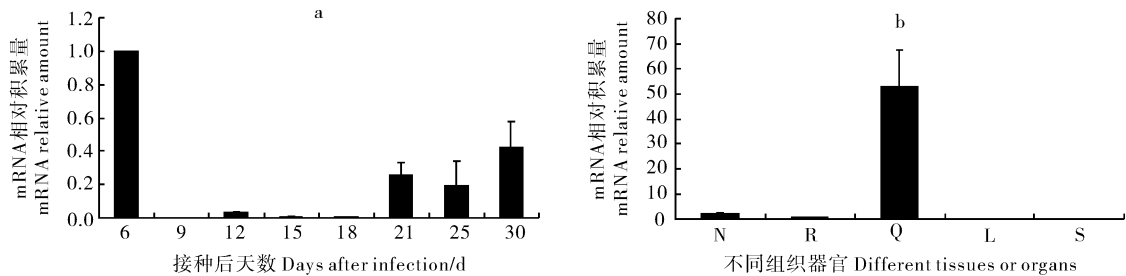
及茎中 *AsB6* 不表达,在根瘤中的表达量大约为未接种对照根中的 2 倍,而在去瘤根中的表达量则非常高,为未接种对照根中的 55 倍,但都比 18S rRNA 基因表达量低。可以看出,在紫云英的共生固氮中晚期,*AsB6* 表达量逐步增强,推测其在共生固氮过程中具有重要的维持作用。

```

1 ATGGCAATGGAGCGAGTTCTTCACATGAAAAGATGGTGTGGGAGAAACAAAGCTACGCCAAT
1 M A M E R V L H M K D G V G E T S Y A N
61 AACTCTTTACTACAAAAGAAAAGTGAATTAAAGAAAAGTGAATCTATCTTGAAGAGG&TATG
21 N S L L Q R K V I K K V K S I L E E D M
121 AAAATGATGATGTGC&AC&CA&CTTTAA&TG&TTG&TATTA&AG&T&AG&CT&G&TTT&AG&G&T&G&C
41 K M M M C N T T L N G C I K V A D L G C
181 TCTTC&GG&ACC&AA&TG&CT&CTT&T&GC&CT&AT&CT&CT&A&T&AT&CAT&CA&CAT&CAT&G&TT&A&T&ACT
61 S S G P N A L M P I S N I I N I I U N T
241 AGCTTGAGCTTGA&GC&AT&G&AG&CC&ACTTTTATTC&AA&TTT&AT&CTT&A&T&G&AT&CT&ATTTG&AA
81 S L S L K H E P L L F Q I Y L N D L F E
301 AATGATTTCA&CA&CT&AT&CTT&CA&G&TT&ACT&CC&CT&G&ATTT&CC&ACC&AA&GC&AT&AAA&CA&AG&AA
101 M D F M T I F K L L P D F H Q S I K Q E
361 TGTGGAGACA&AG&CTTGG&AG&CAT&G&CTT&CGTAA&AT&GC&AA&C&ACC&AG&GA&G&TTTTT&AT&G&GA&AGA
121 C G D N V G A C F U N A T P G S F Y G R
421 CTCTTCT&CT&AG&T&A&TT&AC&AT&CA&AC&GT&CTTTC&ATT&C&CT&CTT&AT&AG&T&G&TT&C&ATT&GG&CT&AT&CC
141 L F P S N Y I N U F H S S Y S U H W L S
481 C&AG&G&C&C&CA&AA&AG&ATTTG&ACC&AA&GA&AG&CA&GA&ACC&ACT&AAA&CA&AG&G&GA&AT&ATTT&AC&ATA
161 Q A P K D L T K E A E P L N K G N I Y I
541 AC&AA&G&CA&AA&G&CT&CG&CA&AT&CT&G&TT&CAT&G&AT&GC&AT&AT&CG&CA&AG&CA&ATTTG&AA&AG&T&G&ATTT&C
181 T K T S S Q S V H D A Y R K Q F E S D F
601 A&AT&AT&TTTTT&AG&AG&T&C&AG&CTTTG&AA&GA&ACTT&GT&GG&AG&G&G&T&G&T&G&AT&G&G&T&AT&T&G&ACT
201 N Y F L E S R F E E L V E G G V M V L T
661 TTTCTTGGC&AA&GA&AA&CA&ACT&A&T&G&AA&ATTTT&GC&CTTTT&AT&G&AA&GT&A&ACT&G&CC&CC&GG&C
221 F L G K E T T N E I L P F Y E V T C P G
721 G&CG&CT&CG&AT&G&CTT&CA&G&AG&G&G&TTT&G&AT&T&GA&AG&AG&G&AA&AA&AG&T&AG&ACTT&G&TT&CG&ATTT&C
241 G R S M L Q E G L I E E E K V D L F D F
781 CCTAT&AT&CA&T&CCA&ACT&AT&TGA
261 P I S S N Y *
    
```

图 2 *AsB6* 开放阅读框的转录翻译产物

Fig. 2 Deduced translation product of opening read frame for *AsB6*



a: *AsB6* 在紫云英结瘤不同时期的表达 Gene expression pattern in a time-course during nodulation;
 b: *AsB6* 在不同组织器官中的表达 *AsB6* gene expression pattern in spatial tissues or organs;

用于荧光定量 PCR 的总 RNA 来自接种根瘤菌后 6、9、12、15、18、21、25、30 d 的感染根 The total RNA was isolated respectively from infected roots at 6, 9, 12, 15, 18, 21, 25 d and 30 d; N: 接种后 26 d 的根瘤 Nodules at 26 d; R: 32 d 的未接种对照根 32-day-old uninfected roots; Q: 接种后 26 d 去掉根瘤的根 Infected roots at 26 d with nodules removed; L: 接种后 26 d 的叶 Infected leaves at 26 d; S: 接种后 26 d 的茎 Infected stems at 26 d; 18S rRNA 为内参 ($P < 0.05$) The 18S rRNA was used as a constitutive control ($P < 0.05$).

图 3 *AsB6* 基因在紫云英结瘤不同时期 (a) 及不同组织器官中的时空表达测定 (b)

Fig. 3 Quantitative fluorescence real-time RT-PCR analysis of mRNA accumulation for *AsB6*

讨 论

SSH 是抑制 PCR 与差减杂交技术相结合的更为简单而快速分离差异基因的方法。本研究采用 SSH 方法成功构建了 2 个感染根和未接种根差异表达 cDNA 基因文库, 获得紫云英共生固氮过程中在感染根(瘤)中增强或特异性表达的 341 个有效 cDNA 克隆, 抑制表达的 186 个有效 cDNA 克隆。对其中的 1 个 *AsB6* 克隆进行深入研究, RACE 获得其基因全长 1 250 bp, BlastP 同源搜索表明, *AsB6* 与苜蓿 酮酯酰合成酶及依赖于 SAM 的羧甲基转移酶具有同源性, 相似度 66%。对于根瘤特异性和增强表达的宿主植物共生固氮基因研究, 目前主要集中在 2 种模式植物苜蓿 (*M. truncatula*) 和百脉根 (*Lotus japonicus*) 中^[12-14]。目前还没有检索到关于该基因的研究报道, 本研究发现了在紫云英共生固氮过程中该基因的增强表达。

该基因在接种早期和固氮晚期大量表达, 接种根瘤菌与未接种对照组的表达差异更是显著, 同时发现该基因在去瘤根 Q 中的表达量最高, 而在根瘤 N 中的表达量并不高, 这种表达特征不同于一般报道的根瘤特异或增强表达的结瘤素基因, 可以认为是一种“结瘤调控”(nodulation-regulated) 型的宿主植物基因, 并且其具有一定的组织特异性, 因为该基因在植物其它组织器官(如叶, 茎)中并不表达。该基因在根瘤形成后开始固氮的中晚期其表达水平逐步上升, 推测其可能与维持根瘤的正常结构和发育、信号传导和代谢有关。文献报道 -酮酯酰合成酶可以调节脂肪酸的链长^[15], 脂肪酸参与信号转导, 同时脂肪酸类物质也是细胞膜的重要组成部分。在紫云英与根瘤菌建立共生固氮体系的过程中, 紫云英根部细胞的细胞膜成分会发生改变^[16-17], 这或许是 *AsB6* 在早期表达水平上调的一个原因, *AsB6* 早期表达水平较高, 表明其参与根瘤菌的前期感染和根瘤形成, 此阶段是共生双方信号分子识别和对话的关键时期; 另据文献报道, 水杨酸的过量累积会影响蚕豆的正常生长^[18], 由于水杨酸的这种毒性, 植物会将水杨酸转化为各种衍生物, 如葡萄糖苷水杨酸, 水杨酸甲酯^[19-20] 等, 以降低水杨酸的含量。其中水杨酸羧甲基转移酶就是该转化过程中重要的某一中间步骤的催化酶^[21]。推测 *AsB6* 在接种根瘤菌的紫云英根部大量表达与抵抗水杨酸的毒害作用也有很大关系。*AsB6* 在紫云英共生固氮过程中的生理

作用和分子机制还有待进一步研究, 如可以采用基因沉默、超表达、转化技术和原位杂交等途径。

参 考 文 献

- [1] 程国军, 陈大松, 李友国, 等. 华葵中生根瘤菌共生基因 *exo56* 的克隆和功能初步分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 483-486.
- [2] 胡国元, 周俊初. 华葵中生根瘤菌研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(6): 213-218.
- [3] 缪礼鸿, 周俊初. 根瘤菌质粒的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 428-434.
- [4] 张学贤, 李阜棣, 曹燕珍. 紫云英根瘤菌分子遗传学研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1): 77-86.
- [5] STRACKE S, KISTNER C, YOSHIDA S, et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis[J]. Nature, 2002, 417: 959-962.
- [6] GHERBI H, MARKMANN K, SVISTOONOFF S, et al. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia bacteria* [J]. PNAS, 2008, 105: 4928-4932.
- [7] 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: 2673-2685.
- [8] CHOU M X, WEI X Y, CHEN D S, et al. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus* [J]. J Plant Physiol, 2007, 164: 764-772.
- [9] FAHRAEUS G. The infection of white clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique[J]. Gen Microbiol, 1957, 16: 374-381.
- [10] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Res Sym Ser, 1999, 41: 95-98.
- [11] MCGUFFIN L J, BRYSON K, JONES D T. The PSIPRED protein structure prediction server [J]. Bioinformatics, 2000, 16: 404-405.
- [12] BENEDITO V A, TORRES-JEREZ I, MURRAY J D, et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula* [J]. Plant J, 2008, 55: 504-513.
- [13] RADU TOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. LysM domains mediate lipochitin oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range[J]. The EMBO J, 2007, 26: 3923-3935.
- [14] 朱浩, 朱辉, 杨绮, 等. 百脉根 AD-cDNA 文库的构建及与结瘤因子受体 NFR1 相互作用蛋白的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 794-799.
- [15] LEONARD J M, KNAPP S J, SLABAUGH M B. A *Cuphea* beta-ketoacyl-ACP synthase shifts the synthesis of fatty acids

- towards shorter chains in *Arabidopsis* seeds expressing *Cu-phea* FatB thioesterases[J]. *The Plant Journal*, 1998, 13 (5) : 621-628.
- [16] BREWIN N J. Development of the legume root nodule[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1991, 7:191-226.
- [17] HIRSCH A M. Developmental biology of legume nodulation [J]. *New Phytologist*, 1992, 122:211-237.
- [18] MANTHE B, SCHULZ M, SCHNABL H. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L. : evidence for salicylic acid metabolism[J]. *J Chem Ecol*, 1992, 18:1525-1539.
- [19] PRIDHAM J B. Low molecular weight phenols in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1965, 6:13-36.
- [20] PIERPOINT W S. Salicylic acid and its derivatives in plants: medicines, metabolites and messenger molecules [J]. *Adv Bot Res*, 1994, 20:163-235.
- [21] FU KAMI H, ASA KURA T, HIRANO H, et al. Salicylic acid carboxyl methyltransferase induced in hairy root cultures of *Atropa belladonna* after treatment with exogenously added salicylic acid [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (9) :1054-1058.

Isolation and Identification of an Up-Regulated Nodulin Gene *AsB6* Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation of *Astragalus sinicus* L.

WU Mei CHOU Min-xia LI Yi-xing CHEN Da-song LI You-guo
*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong
 Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract A cDNA library of *Astragalus sinicus* L. genes specifically expressed in infected roots by *Mesorhizobium huakuii* 7653R was generated by using a PCR-based suppressive subtractive hybridization (SSH) technique with two mRNA populations of infected and uninfected roots. A total number of approximately 527 SSH cDNA clones were obtained, including 341 up-regulated gene clones and 186 down-regulated gene clones. The full-length cDNA sequence of up-regulated *AsB6* gene was obtained by RACE and analyzed through Blasting, GenBank, GenBank EST and Tiger Porcine EST. *AsB6* gene showed 66% similarity with α -etoacyl-ketoacyl synthase and SAM dependent carboxyl methyltransferase in *Medicago truncatula*. The temporal and spatial expression pattern of *AsB6* was estimated using quantitative fluorescence real-time RT-PCR analysis. It was found that its expression level, induced by *M. huakuii* 7653R, in infected roots and nodule was significantly enhanced, and it reached the peak level during the early period of nodulation. The results suggested the symbiotic function of *AsB6* gene might involved in the rhizobium infection, nodulation and maintenance of nodule metabolism.

Key words suppression subtractive hybridization; *Astragalus sinicus*; up-regulated gene; beta-ketoacyl synthase; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑:张志钰)