

拟南芥中根瘤共生基因线路的搭建及其表达分析

梅江鹏 李 豪 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 为研究共生信号途径相关基因在非宿主植物中的表达情况, 通过生物技术及合成生物学方法, 将 10 个能在拟南芥根中表达的启动子和 10 个百脉根共生信号传递的关键基因分别构建 2 个多基因表达载体, 即 pUNS6(含 6 个基因)和 pDNS4(含 4 个基因)。结果表明, 利用毛根转化互补相应豆科植物的突变体, 都能恢复突变体的结瘤功能, 说明克隆的目的基因都具有生物学功能; 通过根瘤农杆菌介导的花序侵染, 将 pUNS6 和 pDNS4 分别转入拟南芥中, 对阳性植株分离和鉴定, 在转基因 T₀、T₁、T₂ 代植株中都鉴定到目的基因, 表明多个共生基因稳定存在于拟南芥基因组上; 利用 RT-PCR 在阳性转基因植株根中都能检测到 mRNA 水平的基因表达。

关键词 百脉根; 拟南芥; 共生信号基因; 花序侵染

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0028-06

豆科植物与根瘤菌的共生固氮是一个高效且经济的过程, 在粮食及饲料作物生产方面有着重要的意义^[1]。这种共生系统是在豆科植物与根瘤菌基于其共生基因的交叉调控下建立的, 这也解释了根瘤菌具有宿主专一性、只能与豆科植物进行共生作用的原因^[2]。随着对豆科模式植物百脉根(*Lotus japonicus*)及苜蓿(*Medicago truncatula*)研究的开展, 已经发现了一系列的共生相关基因^[3-13], 其共生机制得到进一步揭示。百脉根的遗传研究表明, 这个共生信号通路大约由 10 个关键基因组成, 这些基因几乎是触发所有共生反应所必需的, 其相应的突变体不能与根瘤菌建立共生关系, 表明这些基因主要参与共生信号传导。首先, 受体激酶 NFR1 和 NFR5 感知根瘤菌分泌的结瘤因子(Nod factor)后被激活^[3-4], 并将信号传递给共生受体激酶 SymRK^[5-6], 这些激酶形成复合物, 将信号继续向下游传递, 其中包括离子通道蛋白 POLLUX^[7]。依赖 Ca²⁺ 和钙调素的蛋白激酶 CCaMK 可以识别并解码结瘤信号转导中的钙离子信号^[8], CCaMK 与核内的 CYCLOPS(磷酸化底物)形成复合物^[9], 并将信号传递给下游的特异性转录因子, 包括结瘤信号途径蛋白 NSP1 和 NSP2^[10-11], 最后到达结瘤起始基

因 NIN^[12], 形成具有固氮功能的根瘤。另外, 细胞分裂素受体 LHK1 也参与到共生途径中^[13-14], 其突变体植株在接种根瘤菌后出现超侵入线表型^[15]。本研究将这 10 个关键共生基因通过根瘤农杆菌介导的花序侵染导入拟南芥中, 旨在构建一条与根瘤菌形成共生的信号通路, 为非豆科植物-根瘤菌共生的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

百脉根(*L. japonicus*) MG20、Gifu 及其突变体(*nfr1*、*nfr5*、*symrk*、*hit1*、*nsp2*、*ccamk*、*cyclops*、*nin*)种子、蒺藜苜蓿(*M. truncatula*) A17 及其突变体(*dmi1*、*nsp1*)种子、拟南芥 col 种子为笔者所在实验室保存。pYL322-d1、pYL322-d2、pYLTAC380DTH 由华中农业大学生命科学技术学院林拥军教授惠赠; 发根农杆菌 LBA1334/MSU440、根瘤农杆菌 EHA105、大肠杆菌 DH10B 来自笔者所在实验室, 根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAF303099/pHC60/pMP2112 由笔者改造。

1.2 载体的构建

通过 PCR 扩增从百脉根 cDNA 和拟南芥基因

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670240); 教育部高等学校博士学科点专项(20130146130003)

梅江鹏, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌分子生物学, E-mail: 307759820@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

组中获得目的基因片段及启动子片段,利用同源重组^[16]构建到多基因表达载体中。

1.3 拟南芥的种植栽培

拟南芥种子用无水乙醇处理 5 min, 无菌单蒸水洗 4~5 次, 再用 2% 的次氯酸钠溶液(为防止沾壁, 可加入 0.1% Triton X-100)处理 5 min, 然后用无菌单蒸水洗 5~6 次, 最后留部分水浸没种子, 将种子放入 4℃ 冰箱, 放置 2 d 左右。

1) 在土壤中培养。将处理好的种子撒在基质($V_{\text{蛭石}} : V_{\text{珍珠岩}} : V_{\text{营养土}} = 1 : 1 : 1$)土壤上, 种子间隔约 3 cm, 置于光周期为 16 h/8 h(光照/黑暗)和温度为 23~25℃ 光照室中培养, 生长期及时浇水并适当浇灌 1/2 MS 营养液, 待植株开花时(约 10 cm 高)用剪刀切去复叶以上的主花轴, 以促进次生花轴生长。

2) 在方皿中无菌培养。将处理好的种子在超净工作台用 1 mL 移液器打入含 MS 培养基(0.8% 琼脂、9% 蔗糖, m/V)的平皿中, 利用水的流动使种子均匀分布, 吸出多余的水分, 将培养皿置于光周期为 16 h/8 h(光照/黑暗)和温度为 23~25℃ 的培养箱中培养。

1.4 发根农杆菌介导的毛根转化互补

百脉根与苜蓿的毛根转化方法分别参照文献^[17-18], 得到的转化植株移栽至蛭石+珍珠岩($V_{\text{蛭石}} : V_{\text{珍珠岩}} = 1 : 1$)的混合基质中, 4~5 d 后接种带 pHC60 质粒的根瘤菌, 21 d 后观察共生表型。

1.5 根瘤农杆菌介导的花序侵染

将目的质粒利用电转化转入发根农杆菌 EHA105 感受态细胞中, 鉴定正确后接种于 3 mL TY 培养液(含抗生素), 培养 12 h 后, 按 1/100 转接到含抗生素的新鲜 TY 培养基, 待 $D_{600} = 0.8$ 时, 离心收集菌体, 用渗透培养基(0.05% Silwet L-77 + 5% 蔗糖)等体积重悬菌体, 即为转化液。将剪去已开放花朵和果荚的拟南芥倒插入转化液中, 60 s 后取出, 晾干后用塑料袋套住并封口(以保持湿度), 侧放在培养室中过夜, 次日去掉塑料袋, 正常培养, 7 d 后重复转化 1 次(可以提高转化效率), 约 30 d 收集种子, 37℃ 干燥 1 周后放入种子箱中保存。

1.6 转基因植株的筛选与纯合体鉴定

1) T_0 代阳性植株的筛选。花序浸染后直接获得的种子即为 T_0 代, 拟南芥转化植株约 1 个月后种子成熟, 即可收集 T_0 代种子。种子处理、萌发后移至含有 50 mg/L 潮霉素的 MS 固体培养基上, 置于

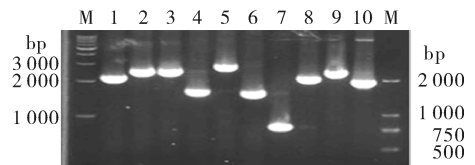
光照培养箱中培养 10 d, 阳性植株长出真叶且根系发达; 野生型植株萌发则相对矮小, 且根系较短。将阳性植株移种入拟南芥营养土中, 每隔 3 d 浇 1 次 1/2 MS 液体营养液。

2) 纯合体植株的筛选。收取 T_0 代阳性植株种子, 37℃ 干燥 1 周。种子处理后播种于营养土中, 为保证至少有 16 粒种子成苗, 可适当多播种子, 长出的植株即为 T_1 代。鉴定 T_1 代植株, 拔去非阳性植株, 余下阳性植株分别收取种子。选取适量 T_1 代种子(来自 4 株 T_1 代阳性植株), 分别播种, 至少 16 粒成苗, 即 T_2 代。鉴定 T_2 代植株, 留下阳性植株, 分别收取种子。重复上述步骤, 直至成苗的 16 株全为阳性植株, 即可认为是纯合体。收取纯合体种子, 置于种子箱中保存备用。

2 结果与分析

2.1 拟南芥根中特异性表达启动子的克隆

为了防止单一启动子引起基因沉默现象发生, 采取不同基因由不同启动子来启动表达的策略, 根据已有的研究, 选取了 *AtPT1*、*AtPT2*、*AtARSK1*、*AtPYK10*、*At3g25820*、*AtPIP5K3*、*AtPGP4*、*AtKC1*、*AtLHT6* 和 *AtNIP2-1* 等 10 个在根中特异性高表达的启动子, 分别设计引物并通过 PCR 从拟南芥基因组中扩增出以上 10 个启动子序列条带, 条带大小与已知的相符(图 1)。切割条带进行胶回收后构建到 pEASY-Blunt3 上, 经测序正确后备用。



M: DNA 标准; 1~10 泳道分别为 *AtPT1*、*AtPT2*、*AtARSK1*、*AtPYK10*、*At3g25820*、*AtPIP5K3*、*AtNIP2-1*、*AtLHT6*、*AtPGP4*、*AtKC1* 扩增片段。M: DNA marker. The lanes 1-10 were the PCR fragments of *AtPT1*, *AtPT2*, *AtARSK1*, *AtPYK10*, *At3g25820*, *AtPIP5K3*, *AtNIP2-1*, *AtLHT6*, *AtPGP4*, *AtKC1*.

图 1 启动子的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of promoters

2.2 多基因表达载体的构建

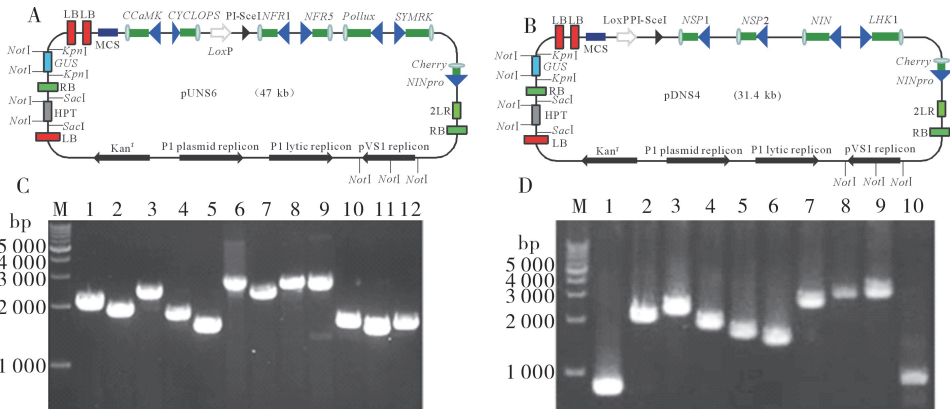
利用设计引物和融合 PCR 技术, 将分别编码百脉根结瘤因子受体激酶 *NFR1*、*NFR5*, 共生受体激酶 *SymRK*, 依赖钙和钙调素蛋白激酶 *CCaMK*, 组氨酸蛋白激酶 *LHK1*, 离子通道蛋白 *POLLUX*, 转录因子 *CYCLOPS*、*NSP1*、*NSP2*、*NIN* 等 10 个基

因,分别与不同拟南芥启动子及不同蛋白标签融合,构建成单个基因表达单元。通过同源重组的方法,将这些单个基因表达单元分别构建成为 2 个多基因表达载体,并命名为 pUNS6 (up-stream nodulation signaling) 和 pDNS4 (down-stream nodulation signaling)。其中 pUNS6 含有结瘤信号上游的 6 个基因(图 2A),pDNS4 含有结瘤信号下游的 4 个基因(图 2B),同时在 2 个多基因表达载体上分别加入了 1 个起始结瘤的报告基因(*NIN pro*、*Cherry*),以检测结瘤信号是否被启动。2 个多基因表达载体经 PCR 验证,检测到每个表达单元各自的条带(图

2C、D),通过全序列测序,确定了各基因在多基因表达载体中的位置(图 2A、B)。

2.3 共生基因毛根转化功能互补分析

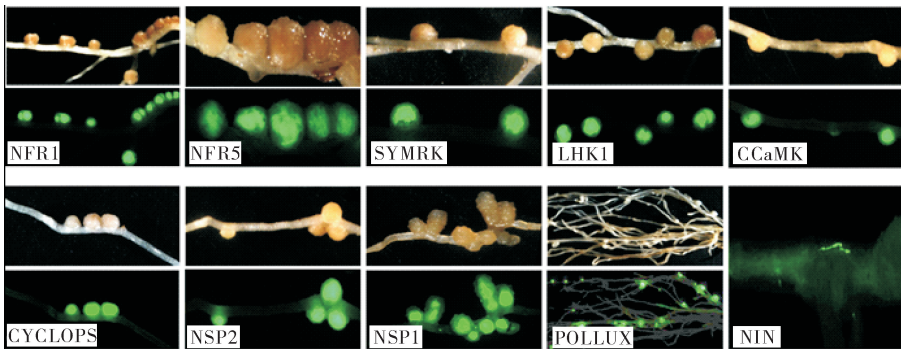
为了验证基因所带的标签对其行使生物学功能是否有影响,分别构建了 pCAMBIA1301-35S-genta-tag 载体,利用相对应的突变体植株进行毛根转化互补。基因功能互补实验结果表明,融合了不同标签的单个基因表达载体均能恢复其相应突变体的结瘤功能(图 3),起始结瘤基因 *LjNIN* 互补突变体后恢复了侵入线的形成,表明构建在载体中的基因所带的标签对其生物学功能没有影响。



A:pUNS6 载体结构示意图; B:pDNS4 载体结构示意图; C:pUNS6 载体中目的片段的 PCR 验证; M:DNA 标准; 1~12 泳道分别为 *AtPT1*、*NFR1*、*AtPT2*、*NFR5*、*AtARSK1*、*SYMRK*、*AtPYK10*、*POLLUX*、*At3g25820*、*CCaMK*、*AtPIP5K3*、*CYCLOPS*; D:pDNS4 载体中目的片段的 PCR 验证; M:DNA 标准; 1~10 泳道分别为 *AtLHT6*、*NSP1*、*AtNIP2-1*、*NSP2*、*AtPGP4*、*NIN*、*AtKC1*、*LHK1*、*NINpro*、*Cherry*。A:Schematic representation of pUNS6 vector; B:Schematic representation of pDNS4 vector. C: PCR of the target fragments in pUNS6 vector. M: DNA marker. Lanes 1-12 were the PCR fragments of *AtPT1*, *NFR1*, *AtPT2*, *NFR5*, *AtARSK1*, *SYMRK*, *AtPYK10*, *POLLUX*, *At3g25820*, *CCaMK*, *AtPIP5K3*, *CYCLOPS*. D: PCR of the target fragments in pDNS4 vector. M: DNA marker. Lanes 1-10 were the PCR fragments of *AtLHT6*, *NSP1*, *AtNIP2-1*, *NSP2*, *AtPGP4*, *NIN*, *AtKC1*, *LHK1*, *NINpro*, *Cherry*.

图 2 多基因表达载体的构建

Fig.2 Construction of multi-genes expression vectors



毛根转化互补植株接种 GFP 标记的根瘤菌 3 周后,在可见光和荧光体式显微镜下观察互补植株结瘤表型,在荧光显微镜下观察到绿色荧光根瘤是由接种的根瘤菌所致。The nodulation phenotypes of complement plants three weeks after inoculation rhizobia labeled with GFP were observed under light and fluorescence microscopes.

图 3 毛根转化互补验证

Fig.3 Complement by hairy root transformation

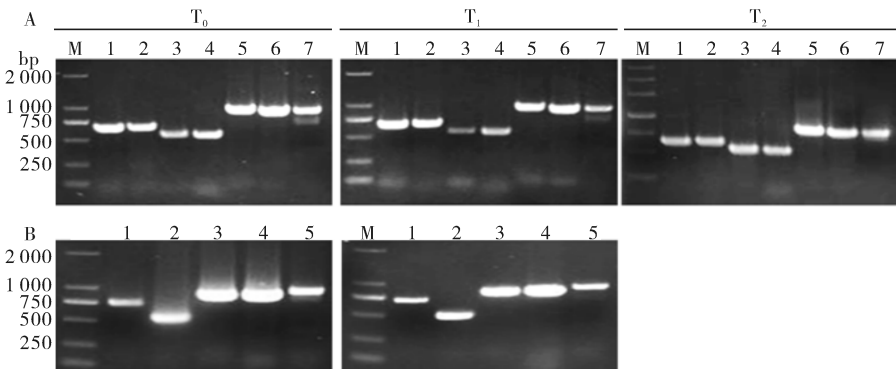
2.4 拟南芥稳定转化阳性植株的获得及目的基因稳定遗传的鉴定

通过农杆菌介导的拟南芥花序侵染法,将 pUNS6 与 pDNS4 表达载体分别导入拟南芥中。经过筛选与鉴定,得到 pUNS6 转化植株 2 株, pDUNS4 转化植株 15 株。转基因植株经继代培育和分离后,获得 pUNS6 的 T₂ 代转基因纯合体植株和 pDNS4 的 T₁ 代转基因杂合体植株。为了确定目的基因在转基因植株中是否能够稳定遗传,选取 pUNS6 与 pDUNS4 转基因植株中的各一个株系,抽提 T₀、T₁ 和 T₂ 代转基因植株基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定(图 4)。结果表明:转基因植株中的目的基

因都存在,可以在稳定转化的阳性植株中稳定遗传。

2.5 拟南芥稳定转化植株中目的基因的表达分析

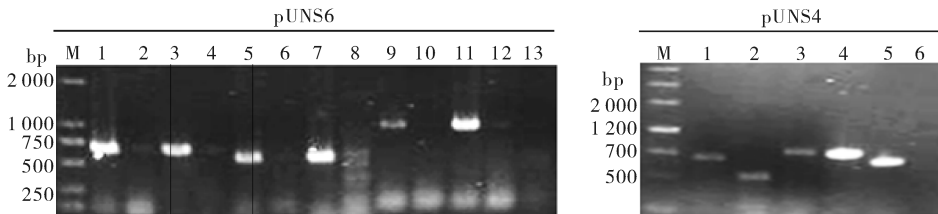
为了证实目的基因在转基因植株中的表达,以 pUNS6 与 pDUNS4 转基因植株的根为材料,分别抽提总 RNA 并反转录 cDNA,以各基因的上下游引物进行 PCR 验证;另外,用 *Cherry* 的上游引物与 *polyA* 的下游引物来排除 cDNA 中可能存在的植物基因组 DNA 带来的干扰。结果显示:*Cherry-polyA* 泳道没有条带,表明反转录得到的 cDNA 中不含基因组 DNA(图 5);转基因植株的 cDNA 中都检测出每个目的基因的条带,证明了转入植株中的目的基因在 RNA 水平上都有表达。



A: pUNS6 转基因植株中目的基因的 PCR 鉴定; M: DL2000 标准; 1~7 泳道分别为 *NFR1*、*NFR5*、*SymRK*、*POLLUX*、*CCaMK*、*CYCLOPS*、*Cherry*。B: pDUNS4 转基因植株中目的基因的 PCR 鉴定; M: DL2000 marker; 泳道 1~5 分别为 *NIN*、*LHK1*、*NSP1*、*NSP2*、*Cherry*。A: Identify the genes in transgenic plants of pUNS6 by PCR. M: DL2000 marker. Lanes 1-5 were the PCR fragments of *NFR1*, *NFR5*, *SymRK*, *POLLUX*, *CCaMK*, *CYCLOPS*, *Cherry*. B: Identify the genes in transgenic plants of pDUNS4 by PCR. M: DL2000 marker. Lanes 1-5 were the PCR fragments of *NIN*, *LHK1*, *NSP1*, *NSP2*, *Cherry*.

图 4 转基因植株中目的基因鉴定

Fig.4 Identification of target genes in transgenic plants



A: 在 pUNS6 转基因植株中目的基因表达检测。M: DNA marker; 1、3、5、7、9、11 泳道分别为 *NFR1*、*NFR5*、*SymRK*、*POLLUX*、*CCaMK*、*CYCLOPS*; 2、4、6、8、10、12 泳道分别以水为模板的阴性对照; 13 泳道为 *Cherry-polyA*。B: 在 pDUNS4 转基因植株中目的基因表达检测。M: DNA marker; 1-5 泳道分别为 *NIN*、*LHK1*、*NSP1*、*NSP2*、*Cherry*; 6 泳道为 *Cherry-polyA*。A: Detection of target genes expression in pUNS6 transgenic plants by RT-PCR. The lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 were the PCR fragments of *NFR1*, *NFR5*, *SymRK*, *POLLUX*, *CCaMK*, *CYCLOPS* respectively, and lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 were negative control with water. M: DNA marker. B: Detection of target genes expression in pDUNS4 transgenic plants by RT-PCR. The lanes 1-5 were the PCR fragments of *NIN*, *LHK1*, *NSP1*, *NSP2*, *Cherry* respectively. M: DNA marker. The lane 13 in pUNS6 and lane 6 in pDUNS4 were *Cherry-polyA*.

图 5 RT-PCR 检测转基因植株中目的基因表达

Fig.5 Detection of target gene expression in transgenic plants by RT-PCR

3 讨 论

利用生物工程技术将豆科共生基因导入非豆科植物中,搭建一条与根瘤菌共生的途径,使非豆科植物具有共生固氮的功能是生物固氮领域研究的重要课题^[19-22]。拟南芥是目前世界上研究最深入、最广泛的模式植物。然而,拟南芥既不具备与根瘤菌共生结瘤的功能,也不具备与丛枝真菌(AMF)形成菌根的功能(已知 80% 以上陆生植物能与 AMF 共生)。本研究选择拟南芥作为研究材料是基于以下两点:其一,考虑到避免内源共生基因可能对外源共生基因线路的干扰和影响;其二,选择拟南芥根特异性表达的不同启动子,是为避免外源共生基因的表达影响植株地上部分的生长和发育。有研究表明,在转多个基因的植株中同一启动子会导致基因缺失、重组及沉默^[23]。本研究将豆科植物百脉根结瘤因子信号途径中 10 个关键基因,分别构建成 2 个多基因表达载体并分别导入非豆科植物拟南芥中,经分离和鉴定后分别得到了 2 个载体稳定表达的纯合体转化植株。虽还未得到一个完整共生通路的转基因植株,但后期可以通过 pUN56 与 pDUN54 转基因植株杂交来完成。此外,本研究使用的是二元表达载体,在完成筛选后,筛选基因被删除,避免了筛选基因转移到细菌造成的危害问题,并且可以继续将其他共生基因导入转基因植株中,为在拟南芥中搭建一条共生基因线路提供材料。

参 考 文 献

[1] STEFFEN W, RICHARDSON K, ROCKSTROM J, et al. Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet[J]. *Science*, 2015, 347(6223): DOI: 10.1126/science.1259855.

[2] VENKATESHWARAN M, VOLKENING J D, SUSSMAN M R, et al. Symbiosis and the social network of higher plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16(1): 118-127.

[3] LIMPENS E, FRANKEN C, SMIT P, et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection[J]. *Science*, 2003, 302(5645): 630-633.

[4] RADUTOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 585-592.

[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(6892): 959-962.

[6] HOLSTERS M, SYMRK, an enigmatic receptor guarding and guiding microbial endosymbioses with plant roots[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4537-4538.

[7] IMAIZUMI-ANRAKU H, TAKEDA N, CHARPENTIER M, et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots[J]. *Nature*, 2005, 433(7025): 527-531.

[8] HAYASHI T, BANBA M, SHIMODA Y, et al. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts[J]. *Plant journal*, 2010, 63(1): 141-154.

[9] 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.

[10] FRUGIER F, KOSUTA S, MURRAY J D, et al. Cytokinin: secret agent of symbiosis[J]. *Trends in plant science*, 2008, 13(3): 115-120.

[11] HAYASHI T, SHIMODA Y, SATO S, et al. Rhizobial infection does not require cortical expression of upstream common symbiosis genes responsible for the induction of Ca²⁺ spiking[J]. *Plant journal*, 2014, 77(1): 146-159.

[12] SUZAKI T, YANO K, ITO M, et al. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus Japonicus* accompanied by auxin response[J]. *Development*, 2012, 139(21): 3997-4006.

[13] CKURSHUMOVA W, BERLETH T. Overcoming recalcitrance-auxin response factor functions in plant regeneration[J]. *Plant signaling behavior*, 2015, 10(7): e993293.

[14] 张恒, 尹珺, 张晴, 等. 百脉根组氨酸蛋白激酶 LHK1 的表达及活性鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(2): 59-63.

[15] MURRAY J D, KARAS B J, SATO S, et al. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis[J]. *Science*, 2007, 315(5808): 101-104.

[16] 李豪, 梅江鹏, 张忠明. 豆科共生关键基因表达载体的构建及其功能互补分析[J]. *中国科技论文*, 2016, 11(24): 2806-2810.

[17] STOUGAARD J, UDVARDI M, PARNISKE M, et al. *Lotus japonicus* handbook [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005: 261-277.

[18] KUSTER H B A, SAMAC D, et al. *Medicago truncatula* handbook[M/OL]// MATHESIUS U, JOURNET E P, SUMNER L W. Transcriptomics. Ardmore: Noble Research Institute, LLC, 2006. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>.

[19] OLDROYD G E D, DIXON R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2014, 26: 19-24.

[20] CHARPENTIER M, OLDROYD G. How close are we to nitrogen-fixing cereals? [J]. *Current opinion in plant biology*, 2010, 13(5): 556-564.

[21] ROGERS C, OLDROYD G E D. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals[J]. *Journal of experimental botany*, 2014, 65(8): 1939-1946.

[22] 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.

multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system[J].Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(10):5962-5967.

[23] LIN L, LIU Y G, XU X P, et al. Efficient linking and transfer of

Construction and expression analyses of nodule symbiosis genes route in *Arabidopsis thaliana*

MEI Jiangpeng LI Hao ZHANG Zhongming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Life Sciences and Technology
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Ten key genes in symbiosis signaling from *Lotus japonicus* were controlled under ten different individual promoters expressed in roots of *Arabidopsis thaliana* with biotechnology and synthetic biology approaches. Two multigenes vectors, pUNS6 containing 6 genes and pDNS4 containing 4 genes, were constructed respectively to transform *Arabidopsis thaliana*. The result of complement assay showed that ten genes controlled in CaMV35S promoter were able to restore symbiotic function of relative genes mutant in leguminous plants with hairy root transformation. The pUNS6 and pDNS4 were transformed into *Arabidopsis* with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated inflorescence infection respectively. The result of identifying the transgenic T₀, T₁ and T₂ plants by PCR and RT-PCR showed that those of foreign symbiotic genes were stably existed on genome and were able to express at the RNA level in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords *Lotus japonicus*; *Arabidopsis thaliana*; symbiosis signaling genes; inflorescence infection

(责任编辑:张志钰)