

技术与方法 Techniques and Methods

百脉根嫁接方法的优化及其在结瘤自调控研究中的应用

李晓琳¹, 孙杰^{1*}, 陈爱民², 王彦章²¹石河子大学农学院, 石河子大学新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832000; ²中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032**摘要:** 嫁接试验是研究结瘤自调控的有效方法。本文优化了百脉根的嫁接方法, 并应用该方法初步研究了百脉根突变体*rel3*根瘤数目减少的机理。结果表明, *rel3*突变体根瘤数目减少的表型是由来自于茎的信号决定。**关键词:** 百脉根; 结瘤自调控; 嫁接Optimization of a Grafting Method of *Lotus japonicus* R. and Its Application in Autoregulation of NodulationLI Xiao-Lin¹, SUN Jie^{1*}, CHEN Ai-Min², WANG Yan-Zhang²¹College of Agriculture, Shihezi University/Key Laboratory of Oasis Eco-agriculture, Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi, Xinjiang 832000, China; ²National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China**Abstract:** Grafting is one of effective approaches to study autoregulation of nodulation. A grafting method of *Lotus japonicus* was modified and the mechanism of decrease in nitrogen-fixing nodules of *L. japonicus rel3* mutant was investigated. The results indicated that the phenotype of reduced nodule number of *rel3* mutant was in control of shoot-derived signals.**Key words:** *Lotus japonicus*; autoregulation of nodulation; grafting

在氮素匮乏的土壤中, 豆科植物能与土壤中的根瘤菌进行共生相互作用。这种共生作用诱导宿主植物产生一个全新的根部侧生器官——固氮根瘤。固氮根瘤是豆科植物在氮贫瘠的土壤中所必需的, 但产生过多的根瘤会抑制植物的生长, 因此, 根瘤的数目受到严格的调控。其中, 主要的外部因子是乙烯和硝酸盐(Carroll等1985a, b; Ferguson和 Mathesius 2003; Ferguson等 2005; Lohar等 2009)。而宿主植物能够主动地采用一种称为结瘤的自我调控或反馈调节机制来控制结瘤数目的多少。该机制由2个长距离信号途径组成, 一个来自于根, 一个源自于茎(Caetano-Anollés和 Gresshoff 1991; Oka-Kir和 Kawaguchi 2006)。

豆科植物的自我调控系统若被阻断, 则呈现超级结瘤表型。目前已发现许多超结瘤突变体, 如百脉根中的 *har1* (Wopereis等 2000; Kawaguchi等 2002)。HARI的直向同源基因 *GmNARK* (Nishimura等 2002a; Searle等 2003)、*SYM29* (Krusell等 2002)

和 *SUNN* (Schnabel等 2005) 突变后也都表现出超级结瘤的表型。在大豆(Delves等 1986; 1987)、百脉根(Nishimura等 2002b; Oka-Kira等 2005)和蒺藜苜蓿(Penmetsa等 2003)中, 嫁接试验被广泛地用来研究茎对结瘤自我调控的影响。嫁接实验结果表明, 这些超级结瘤突变体中源自于茎的信号存在缺陷。百脉根结瘤数增多的突变体 *klv* 与野生型的相互嫁接实验证明突变体中源自于茎的长距离信号被削弱(Oka-Kira等 2005)。根瘤数减少的百脉根突变体 *lot1* 与野生型植株的相互嫁接实验证明, *lot1* 的结瘤表型是由根信号决定的。突变体 *lot1* 与超

收稿 2009-12-30 修订 2010-04-12

资助 新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室开放课题(200503)和“973”项目(2010CB126501)。

致谢 罗达先生提供百脉根突变体种子, 杨军先生帮助修改文章。

* 通讯作者(E-mail: sunjie@shzu.edu.cn; Tel: 0993-2057201)。

级结瘤突变体 *har1* 相互嫁接后形成中间数目的根瘤, *lot1har1* 的双突变形成的根瘤数也在单突变植株结瘤数之间, 另外 *lot1* 突变体中 *HAR1* 基因的相对表达水平与野生型一样, 证明 *LOT1* 可能是在不同于 *HAR1* 所作用的自我调控信号转换途径上起作用的(Ooki 等 2005)。

本实验室对百脉根 EMS 诱变突变体进行共生表型筛选鉴定, 获得一个结瘤数目减少的突变体 *rel3* (未发表资料)。本文通过突变体 *rel3* 与野生型相互嫁接, 来研究其根瘤数目减少的表型是受茎信号还是根信号决定的。

材料与方法

1 植物材料与菌株

植物材料为百脉根 (*Lotus japonicus* R.) 野生型 Gifu B-129 和突变体 *reduced leaflet 3 (rel3)*。*rel3* 突变体是经 EMS 诱变的百脉根突变体 (Gifu 遗传背景), *rel3* 突变体除了基部小叶缺失、小叶变窄、花不育等非共生表型外, 经鉴定其共生的表型也存在缺陷, 突变体形成的根瘤数仅为野生型的一半左右。组成型表达 LacZ 活性的百脉根中慢生根瘤菌 NZP2235/*HemA::LacZ* 为本实验室保存。

2 培养基和营养液

植物培养基为 MS 培养基; 根瘤菌的培养基为 TY 培养基; 嫁接植株结瘤过程浇灌的无氮营养液为 B+D 营养液 (Broughton 和 Dilworth 1971)。

3 实验方法

嫁接试验是研究茎分枝的控制、开花和抗病性等重要方法之一, 本文对百脉根的嫁接方法进行了改进和优化。

3.1 种子灭菌萌发 百脉根种子置于 37 °C 培养箱干燥 24~48 h, 促进种子后熟。然后, 将种子置于液氮中速冻 60 s, 取出种子; 75% 乙醇对种子表面消毒 60 s, 7% 次氯酸钠消毒 15 min, 无菌水清洗 6~8 次。将消毒后的种子铺到 1% 的水琼脂平板上, 28 °C 下倒置暗培养约 36 h 至出现 1 cm 左右的胚根。

3.2 突变体的筛选 由于突变体 *rel3* 是隐性纯合不育的, 所以必须通过杂合子保种。后续试验也是从杂合子分离的植株中筛选出突变体进行研究。将萌发好的种子, 铺到覆有一层滤纸的 MS 培养基上 (培养基上加一层滤纸更易于后续幼苗的移动) (图

1-a), 在 23 °C/18 °C (昼/夜)、16 h/8 h (昼/夜)、光照强度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光周期条件下培养。5 d 后子叶全部展开, 杂合子与野生型的子叶相似, 子叶呈椭圆, 边缘略向下 (图 1-b 左); 突变体的子叶狭长, 边缘略上卷, 整个子叶下卷呈拱形 (图 1-b 右)。通过辨别子叶筛选出 *rel3* 并重新移置 MS 培养基上, 对野生型做同样的处理, 然后培养 3 d。

3.3 突变体与野生型相互嫁接 用手术刀将嫁接苗从子叶下方色素沉积的部位切开 (图 1-b 箭头所示部位), 立刻将茎浸入在无菌水中 (图 1-d)。把长为 0.5~0.8 mm、直径为 0.8 mm 的无菌聚乙烯管套在根上 (图 1-e), 然后将不同植株的茎再插入聚乙烯管, 并使茎与根的切口在管内紧密接触 (图 1-f)。之前报道的嫁接多在纸袋或滤纸上进行 (Nishimura 等 2002b; Oka-Kira 等 2005), 本文直接在培养基上进行嫁接以减少嫁接过程中对幼苗根系的损伤。以野生型和 *rel3* 突变体为材料, 相互嫁接分析了 *rel3* 突变体根瘤减少的表现是受根信号还是茎信号调控。嫁接分 4 种组合: 突变体的茎嫁接到野生型的根上 (*rel3*/WT)、野生型的茎嫁接到突变体的根上 (WT/*rel3*) 和突变体、野生型的自身嫁接 (*rel3*/*rel3*、WT/WT)。嫁接好的材料用滤纸遮住子叶以下部分进行避光, 同时滤纸起到保湿和固定作用。在 23 °C/18 °C (昼/夜)、16 h/8 h (昼/夜)、光照强度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的条件下培养 2 周。

3.4 结瘤试验 取培养 7、10、14 d 的野生型自身嫁接幼苗进行嫁接结瘤, 分析不同苗龄进行嫁接结瘤的成功率。将嫁接后培养 2 周的苗剪掉聚乙烯管口长出的侧根 (图 2-a), 移到无菌蛭石 (蛭石: 珍珠岩 = 3:1) 中 (图 1-g), 保湿遮光培养 3 d 后接菌 ($\text{OD}_{600}=0.5$)。将过夜培养根瘤菌 NZP2235/*HemA::LacZ* 悬浮液, 4 °C 离心 (4 000×g) 10 min 收集菌体, 0.9% 生理盐水重悬菌体, 然后 4 °C 离心 10 min 收集菌体, 再用生理盐水或 B+D 无氮营养液重悬菌体使 OD_{600} 在 0.3~0.8 之间, 每棵植株淋菌 1 mL, 结瘤期间, 定期浇 B+D 无氮营养液。接菌 3 周后分析结瘤情况。实验重复 3 次。

结果与讨论

1 嫁接植株成功结瘤的分析

豌豆的分裂根试验表明, 宿主植物一部分根上

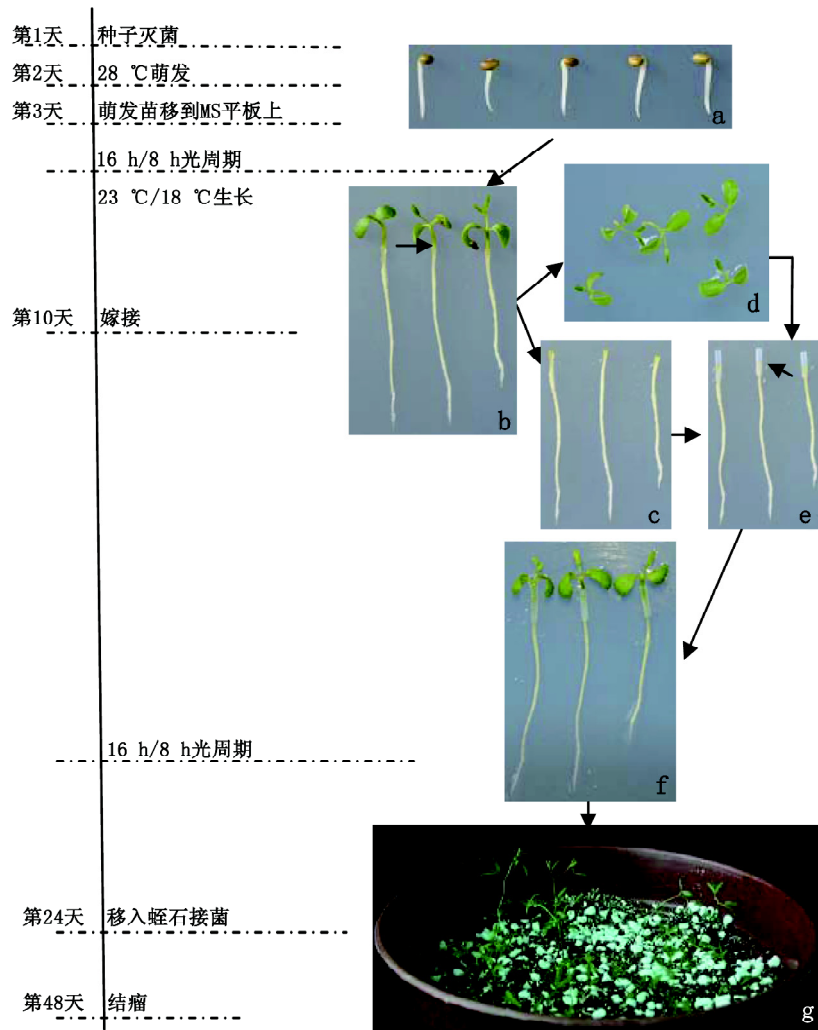


图1 百脉根的嫁接流程图

Fig.1 Flow chart of *L. japonicus* grafting experiments

a: 灭菌萌发后2 d 的种子; b: 用于嫁接的子叶, 箭头指示切割的部位; c: 嫁接时作砧木的根; d: 嫁接时作接穗的茎; e: 嫁接时作砧木的根, 箭头指聚乙烯管的位置; f: 嫁接后的植株; g: 嫁接植株的蛭石结瘤。

的结瘤会影响另一部分根后续的结瘤(Kosslak 和 Bohlool 1984)。在实验过程中发现, 嫁接苗培养2周后, 可以看到部分嫁接植株的聚乙烯管口有新长出的侧根(图2-a), 这些侧根来自接穗或砧木。为了避免来自接穗的侧根影响后续结瘤效果, 将嫁接苗移入蛭石前需剪掉新生的侧根。在结瘤3周后, 发现仍有部分植株的聚乙烯管口有侧根并且结瘤(图2-b)。因此, 本文仅对嫁接成活并且其聚乙烯管口没有侧根(图2-c)或存在侧根但其侧根上并未结瘤植株作结瘤情况统计。这样就排除了来自接穗的新生侧根对作为砧木的整个根系结瘤所产生的影响。在嫁接过程中, 不移动作为砧木的根, 对平

皿中培养基上的幼苗直接进行嫁接, 从而减少了对根的损伤, 并使嫁接植物处于一个丰富的营养条件和稳定的湿度环境中, 嫁接的成活效率达到90%以上, 最终成功嫁接结瘤植株的比率达到55.89%。通过实验发现, 聚乙烯管接穗与砧木的接口处固定的越紧密, 成活的效率越高, 长出侧根的比率也越低, 最终嫁接成功结瘤的比率越高。

2 不同苗龄野生型自身嫁接植株结瘤的比较

不同苗龄嫁接植株结瘤的分析结果显示, 培养7、10、14 d进行嫁接的成功率均达到了90%以上, 但嫁接后结瘤的成功率分别为51.5%、63.45%和52.72%。这表明培养10 d的幼苗最适合嫁接。

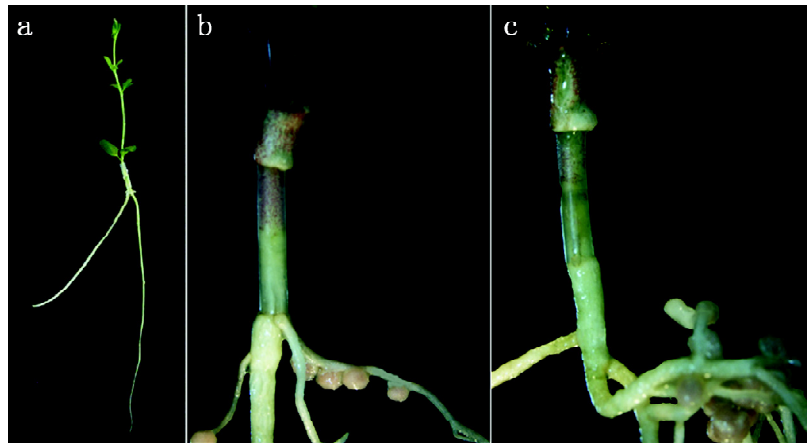


图2 成功嫁接植株的结瘤分析

Fig.2 Analysis of successful grafting plants inoculated with NZP2235/*HemaA::LacZ*

a: 嫁接2周后的植株; b: 结瘤不成功的嫁接植株; c: 结瘤成功的嫁接植株。

3 野生型与 *rel3* 突变体嫁接结瘤分析

图3显示, *rel3* 突变体自身嫁接(*rel3/rel3*)平均每株结瘤约19个, 野生型自身嫁接(WT/WT)平均每株约32个根瘤。以 *rel3* 突变体的茎做接穗与野生型的根做砧木相互嫁接(*rel3*/WT)后接种, 平均结瘤约21个, 比 *rel3* 突变体自身嫁接(*rel3/rel3*)的结瘤数稍有增加, 但与野生型自身嫁接(WT/WT)的结瘤数间存在显著差异。而野生型的茎为接穗与 *rel3* 突变体的根为砧木嫁接(WT/*rel3*)后接种, 平均结瘤约29个, 与野生型自身嫁接(WT/WT)的结瘤数无明显差异, 但与突变体自身嫁接(*rel3/rel3*)的结瘤数相比存在显著差异。这表明, 突变体 *rel3* 根瘤数目减少的表型受到茎信号调控。在百脉根中, 发现包含21个亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)

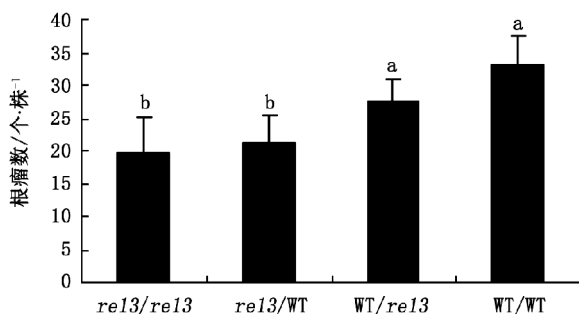


图3 突变体 *rel3* 与野生型相互嫁接后结瘤数
Fig.3 Nodule number of mutual grafting plants with *rel3* and wild type

不同小写字母表示在 0.05 水平有显著差异。

的受体激酶HAR1参与了结瘤自我调控和硝酸盐对结瘤的抑制, 被公认为是存在于茎中接收来自根部结瘤信号的受体(Okamoto等2009)。那么REL3是与HAR1相互作用还是在其调控途径之外起作用的, 还有待于进一步研究和探索。

参考文献

- Broughton WJ, Dilworth MJ (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J*, 125: 1075~1080
- Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol*, 45: 345~382
- Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM (1985a). A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (*nts*) soybean mutant. *Plant Physiol*, 78: 34~40
- Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM (1985b). Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 4162~4166
- Delves AC, Higgins A, Gresshoff PM (1987). Shoot control of supernodulation in a number of mutant soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. *Aust J Plant Physiol*, 14: 689~694
- Delves AC, Mathews A, Day DA, Carter AS, Carroll BJ, Gresshoff PM (1986). Regulation of the soybean-*Rhizobium* nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiol*, 82: 588~590
- Ferguson BJ, Mathesius U (2003). Signaling interactions during nodule development. *J Plant Growth Regul*, 22: 47~72
- Ferguson BJ, Wiebe EM, Emery RJN, Guinel FC (2005). Cytokinin accumulation and an altered ethylene response mediate the pleiotropic phenotype of the pea nodulation mutant R50 (*sym16*). *Can J Bot*, 83: 989~1000
- Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Koiwa H, Niwa S, Ikuta A, Syono K, Akao S (2002). Root, root hair, and symbiotic

- mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1: 17~26
- Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, et al (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, 420: 422~426
- Kosslak RM, Bohlool BB (1984). Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol*, 75: 125~130
- Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM (2009). Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann Bot*, 104: 277~285
- Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, et al (2002b). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, 420: 426~429
- Nishimura R, Ohmori M, Fujita H, Kawaguchi M (2002a). A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15206~15210
- Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Cur Opin Plant Biol*, 9: 496~502
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura K-I, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S, Shikazono N, Tanaka A, et al (2005). *klavier (klv)*, A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J*, 44: 505~515
- Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M (2009). Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol*, 50: 67~77
- Ooki Y, Banba M, Yano K, Maruya J, Sato S, Tabata S, Saeki K, Hayashi M, Kawaguchi M, Izui K, et al (2005). Characterization of the *Lotus japonicus* symbiotic mutant *lot1* that shows a reduced nodule number and distorted trichomes. *Plant Physiol*, 137: 1261~1271
- Penmetsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook D (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 131: 998~1008
- Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J (2005). The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a *CLV1*-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol*, 58: 809~822
- Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a *CLAVATA1*-like receptor kinase. *Science*, 299: 109~112
- Wopereis J, Pajuelo E, Dazzo FB, Jiang Q, Gresshoff PM, de Bruijn FJ, Stougaard J, Szczyglowski K (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J*, 23: 97~114