科学通报 2021 年 第 66 卷 第 28-29 期: 3719 ~ 3731
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

蒺藜苜蓿重金属转运蛋白HMA5基因在共生结瘤中的功能分析

杨墨†, 徐铭英†, 张璐, 丑敏霞*

西北农林科技大学生命科学学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业与环境微生物学陕西省重点实验室, 咸阳 712100
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: minxia104@nwafu.edu.cn

2021-02-08 收稿, 2021-03-09 修回, 2021-03-10 接受, 2021-03-11 网络版发表
国家自然科学基金(41977052)和陕西省重点研发计划(2020ZDLNY07-09)资助

摘要 重金属转运ATP酶(heavy metal transporting ATPase, HMA)主要参与植物体内重金属的转运. 前期研究发现, HMA5基因与苜蓿铜胁迫及共生结瘤相关. 为探明豆科植物根瘤中的铜离子吸收、转运及平衡机制, 本研究以模式豆科植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, Mt)为材料, 对其HMA5同源基因*MTR_8g079250*在共生结瘤中的功能进行了初步研究. 亚细胞定位分析表明, *MTR_8g079250*主要定位于细胞膜和细胞核上; GFP::MTR_8g079250融合表达分析显示, *MTR_8g079250*主要在根瘤的分生区、侵染区、皮层和根的中柱、根冠表达, RNAi沉默目的基因后对共生固氮表型没有产生明显影响. 然而, 目的基因过表达植株的鲜重和单株根瘤数目较野生型明显降低, 侵染线和根瘤原基也显著减少; 透射电子显微镜分析表明, 根瘤细胞中含有少量的类菌体且形状不规则, 环类菌体空间增大, 呈现出早衰的迹象; qRT-PCR结果显示, 结瘤标志性基因*NIN*、*DMI1*、*ENOD11*和豆血红蛋白基因的表达水平均有不同程度的下调, 豆血红蛋白基因的表达水平也有所下调. 这些结果表明, *MTR_8g079250*过表达对共生结瘤有抑制作用.

关键词 蒺藜苜蓿, HMA5, 共生固氮, 定位分析, 过表达

豆科植物之所以能够在氮素限制的环境中生长, 是因为它们与土壤中的根瘤菌进化出了共生关系, 导致形成新的器官, 即根瘤. 在根瘤中, 根瘤菌通过生物固氮将氮素还原为氨供给宿主豆科植物, 用以交换其所需要的物质和能量. 在此共生体系中, 豆科植物可以为根瘤菌提供金属微量元素[1]. 铜作为生物体所必需的微量矿质元素之一, 参与了植物的生长、发育及器官分化过程. 在豆科植物-根瘤菌共生固氮过程中, 铜是众多关键酶的辅助因子, 如作为超氧化物歧化酶辅因子参与根瘤中的自由基代谢, 作为细胞色素氧化酶辅因子参与呼吸链电子传递过程等; 同时铜离子也是酪氨酸酶的辅因子, 对细菌的生长至关重要. 有研究表明, 豆科植物与根瘤菌共生后会增强植物对重金属铜的抗性, 例如在铜胁迫下接种根瘤菌, 可以缓解铜对植物的生长抑制[2]. 然而, 铜过量也会对共生固氮产生毒害. 例如在铜过量的情况下, 根瘤的固氮区中会积累大量的H_2O_2, 导致固氮效率显著降低. 这是由于铜过量时谷胱甘肽和过氧化氢酶不能及时清除植物产生的H_2O_2, 从而损伤植物细胞[3]. 由此可见, 铜含量过高或过低都不利于植物的正常生长发育, 会影响到包括共生固氮在内的诸多生理过程, 因此植物中的铜含量必须维持在一定的生理范围内. 为此, 高等植物进化出了复

引用格式: 杨墨, 徐铭英, 张璐, 等. 蒺藜苜蓿重金属转运蛋白HMA5基因在共生结瘤中的功能分析. 科学通报, 2021, 66: 3719–3731
Yang M, Xu M Y, Zhang L, et al. Functional analysis of heavy metal transporter HMA5 gene in symbiotic nodulation of *Medicago truncatula* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 3719–3731, doi: 10.1360/TB-2021-0164

© 2021《中国科学》杂志社

杂的生理机制以维持细胞内铜稳态的平衡[4]. 植物体通过吸收、分布、利用、储存和外排等过程对金属离子的平衡进行调控, 在调控的过程中重金属转运蛋白发挥了重要作用. 植物体内与铜转运相关的蛋白包括COPT转运蛋白、P_{1B}型ATP酶、分子伴侣、ZIP转运蛋白家族、麦根酸和烟酰胺等[5].

重金属转运ATP酶(heavy metal transporting ATPase, HMA)是一种通过水解ATP跨膜运送重金属阳离子的转运蛋白, 属于P-ATPase家族中的一个亚类. HMA中的P_{1B}被证实与重金属的转运相关, 可以选择性吸收和运输植物生长发育所必需的金属离子(Cu^+、Cu^{2+}、Zn^{2+}和Co^{2+})和一些非必需的重金属离子(Cd^{2+}和Pb^{2+})[6~8]. 目前, 对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At)、水稻(*Oryza sativa*, Os)和黄瓜(*Cucumis sativus*, Cs)等植物的HMA家族基因进行了较多研究[9~14], 对豆科植物中包括HMA5在内的P-type ATPase的研究鲜有报道. 同时, 豆科植物根瘤中的离子转运研究也并不多见, 许多具体细节有待探明. 本实验室前期从天蓝苜蓿中分离到一个与铜胁迫及共生结瘤相关的HMA5基因, 本研究即以豆科模式植物蒺藜苜蓿的HMA5基因为研究对象, 通过RNA干扰、过表达及表达定位等方法对其在共生结瘤过程中的功能进行初步鉴定, 为最终探明豆科植物根瘤中的铜离子吸收、转运及平衡机制奠定基础.

1 材料与方法

(ⅰ) 植物培养和处理. 以蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, Mt)A17为植物材料, 选取状态良好的种子用浓硫酸处理10 min, 无菌水清洗. 30%的次氯酸钠溶液浸泡种子8 min, 无菌水清洗后28°C摇床孵育3 h. 种子平铺在水琼脂培养基上, 28°C黑暗萌发48 h. 将发芽的种子转移到无菌基质中(蛭石:珍珠岩=2:1). 实验设置3组, 分别加入硫酸铜至终浓度为0、50和200 mg/kg的. 室温放置一周后装盆. 接种根瘤菌*Sinorhizobium meliloti* 1021(A_{600}=0.1)于长出真叶的幼苗根部.

(ⅱ) 蒺藜苜蓿HMA5基因系统发育分析. 对蒺藜苜蓿中的HMA5所有相关基因进行聚类分析构建系统发育树. 系统发育分析选取的物种为: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At)、葡萄(*Vitis vinifera*, Vv)、水稻(*Oryza sativa*, Os)、黄瓜(*Cucumis sativus*, Cs)、卷柏(*Lycophyte selaginella*, Ls)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, Pt)、高粱(*Sorghum bicolor*, Sb).

(ⅲ) RNA的提取及反转录. 定期取蒺藜苜蓿转化苗的根部样品0.25 g, 锡箔纸包严后液氮速冻, −80°C保存. 使用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit试剂盒进行RNA提取. 将获得的RNA, 使用HiScript II Q Select RT SuperMix反转录酶进行反转录, 获得cDNA.

(ⅳ) 蒺藜苜蓿HMA5基因表达分析. 分别在接菌5、10、18、23和28 d后提取50和200 mg/kg硫酸铜处理的接菌和不接菌蒺藜苜蓿根部RNA. 使用SYBR Green Real-time PCR Master Mix(Takara)进行qRT-PCR. 所用引物为: *MTR_8g079250*-F: ACTGTTGTTTTCTGCGTTATGG、*MTR_8g079250*-R: CAATGGCGTCACGTATGCT、MTR_8g012390-F: TGGTTTAGCTTTAGAGGAGG、 MTR_8g012390-R: AGACACCAAGACATTAGCATC、MTR_5g010420-F: AGTTGGTGCATCTCAGGGTG、MTR_5g010420-R: GCTAGTGGATGTTCGCTGTTC. 在无酶PCR管中依次加入10 μL SYBR GreenI Master Mix(Takara), 0.8 μL P1、0.8 μL P2、2 μL cDNA模板，用ddH_2O补至20 μL. 用两步法进行扩增. 第一步: 95°C加热10 min, 进行一个循环; 第二步: 95°C加热15 s, 60°C加热1 min, 进行40个循环. 溶解曲线从60℃上升到90°C, 速度为0.5°C/s. 对每个试验样品均设置3次重复, 以确保准确性. 以蒺藜苜蓿的持家基因*Actin*作为内参, 基因表达水平与相对量化分析采用$2^{-\Delta\Delta C_T}$方法[15], 使用SPSS 19.0软件绘图.

(ⅴ) *MTR_8g079250*基因时空表达分析. 通过预测与鉴定, 确定*MTR_8g079250*为研究对象. 通过qRT-PCR技术检测*MTR_8g079250*在接菌和不接菌条件下的表达差异, 取样时间为接菌后0、3、5、7、10、15和25 d. 对接菌后28 d蒺藜苜蓿的茎部、叶片、根瘤和去瘤根分别取样, 提取RNA反转录获得cDNA后, 检测该基因在蒺藜苜蓿不同组织中的表达情况.

(ⅵ) *MTR_8g079250*基因的洋葱亚细胞定位. 使用特异性引物扩增*MTR_8g079250*基因全长序列: 上游引物为C50-F: *ACTCTAGAGGATCTCGAG*ATGGGTCGTAAAAAGTTTG; 下游引物为C50-: *CATGGTACCCCGCTCGAG*TTCAATTTGAATACCATTC斜体标记的核苷酸与载体同源, 下同, 在两端添加*Xho* Ⅰ酶切位点. 使用ClonExpress® Ⅱ一步克隆试剂盒(Vazyme, 南京)将扩增的片段克隆到洋葱表皮亚细胞定位载体中, 生成*MTR_8g079250*-GFP. *MTR_8g079250*-GFP在洋葱表皮细胞中通过使用生物特性的PDS-1000/He粒子

传递系统(Bio-Rad)进行基因枪转化法瞬时表达. 洋葱表皮细胞用4% NaCl处理5 min, 25°C避光孵育24~48 h后立即进行显微镜观察.

(ⅶ) *MTR_8g079250*烟草叶片亚细胞定位. 根据目的基因的编码框设计上下游引物Y50-F(*CTAGTCTAGA*ATGGGTCGTAAAAAGTTTG)及Y50-R(*TCCCCCCGGG*TTCAATTTGAATACCATTC)扩增目的片段. 在载体*Xba* Ⅰ和*Xma* Ⅰ位点进行双酶切并回收产物, 使用T4连接酶对线性化载体和目的片段进行连接, 构建p35S::MTR_8g079250::eGFP载体. p35S::MTR_8g079250::eGFP通过农杆菌瞬时化法注射本塞姆氏烟草叶片, 注射后的烟草暗培养24 h后转入普通光照培养箱培养2~5 d, 用刀片切取约1 cm×1 cm注射后的叶片, 清水制片, 置于激光共聚焦显微镜下进行观察.

(ⅷ) 启动子融合表达载体. 使用PromoterScan软件对*MTR_1g083380*进行分析, 预测启动子序列, 使用Primer Premier 5.0软件设计引物, 包含*MTR_8g079250*基因前的-2001-1序列: PR50-F, *CTTGGCTGCAGGTCGACG*GATATTCCGGTGACTTTAAT; PR50-R, *TTAGAATTCCCGGGGATC*TAATATCAATAATTGTTCCT. 提取蒺藜苜蓿A17的DNA为模板, 扩增目的片段, 通过同源重组法构建pMTR_8g079250::GUS融合表达载体, 方法同(ⅵ). 将重组载体质粒用电转的方法转入发根农杆菌感受态Arqua1后进行发根转化. 取接种根瘤菌后7 d的转化植株进行GUS染色后, 用光学显微镜观察启动子表达部位.

(ⅸ) RNA干扰载体的构建. 使用软件Premer Premier 5.0在目的基因的5′端和3′端各设计一组引物: RNAi-1F, 5′-*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT*TCTGCGTTATGGGAATGA-3′; RNAi-1R, 5′-*GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT*GTTGGAGGAGCAAGAAGTAC-3′; RNAi-2F, 5′-*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT*TTGACCTTGCAAAGAAAACT-3′; RNAi-2R, 5′-*GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT*TCATCTCCAAGTTGTTAAGC-3′. RNAi-1干扰片段为目的基因CDS的169~448 bp; RNAi-2干扰片段为目的基因CDS的2731~2965 bp. 分别在上下游引物的两端添加attB1和attB2位点序列(以斜体字表示), 确保目的基因可以在BP克隆酶的作用下与载体发生位点特异性重组: 根据Gateway BP clonase的说明书与载体进行BP克隆重组, 构建pMTR_1g083380-RNAi载体. 利用干扰载体上的酶切位点*Xba* Ⅰ和*Xho* Ⅰ, 使用限制性内切酶分别对重组质粒进行单酶切验证.

(ⅹ) 过表达载体构建. 按照亚细胞定位载体的构建方法对载体p35s1301进行重组构建, 转入发根农杆菌感受态Arqua1细胞并检测阳性克隆.

(ⅹi) 蒺藜苜蓿发根转化及鉴定. 毛状根转化的具体方法参见《蒺藜苜蓿手册》(https://www.noble.org/medicago-handbook/). 取接菌7 d后的转化植株, 清水冲洗根部, 除去杂质后放置于GUS染色液中浸泡染色, 37°C数小时至过夜. 在70%的乙醇中进行脱色, 直到阴性对照的相应组织呈现白颜色. 取接菌(lac Z标记)7 d后的转化植株: 0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液固定1 h, 缓冲液浸泡冲洗15 min, 重复两次. X-gal染色法检测β-半乳糖苷酶的活性, 染液浸没根部, 黑暗条件下室温过夜. 次日除去染液, 用0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液冲洗根部10 min, 重复3次; ddH_2O冲洗5 min, 重复2次. 用10%的漂白剂浸泡植物材料1~3 min, ddH_2O冲洗3次.

2 结果

2.1 HMA5系统发育分析

HMA中的P_{1B}被证实与重金属的转运相关[6,16,17]. 拟南芥和水稻中分别含有8和9个P_{1B}-ATPase家族成员[8]. 双子叶模式植物拟南芥中HMA家族中的所有成员均已进行了功能鉴定和分类. 其中AtHMA5参与Cu由根部到茎部的转运以及根部的解毒[7,18]. 对蒺藜苜蓿中的HMA所有相关基因进行聚类分析构建系统发育树, 确定蒺藜苜蓿HMA5家族的相关基因. 以目前分类明确的HMA家族基因为依据, 使用软件MEGA6, 用最大似然法构建系统发育树(图1). 与各物种HMA基因进行对比分析发现, 蒺藜苜蓿中的*MTR_8g079250*、*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*与其他物种的HMA5家族基因聚类在一起, 预测这3个基因属于蒺藜苜蓿HMA5家族.

2.2 蒺藜苜蓿HMA5基因表达分析

提取蒺藜苜蓿A17根部cDNA, 内参基因为*Actin*, 通过qRT-PCR检测接菌和不接菌条件下*MTR_8g079250*、*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*在根中的表达差异, 发现3个基因在接种根中均受到不同程度的诱导. 其中, *MTR_8g079250*主要在共生前期表达, 在接菌后5 d(5 dpi, days post-inoculation)被强烈诱

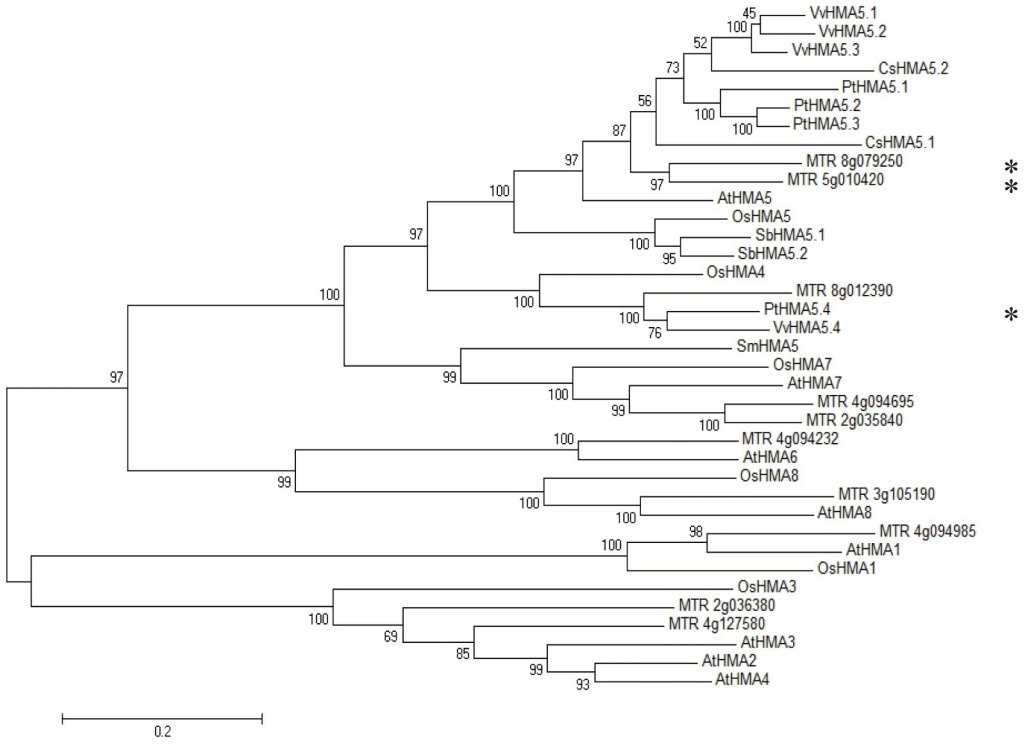


图 1 HMA5系统发育分析. *为蒺藜苜蓿中的HMA5同源基因. 系统发育分析选取的物种: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At)、水稻(*Oryza sativa*, Os)、黄瓜(*Cucumis sativus*, Cs)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, Pt)、葡萄(*Vitis vinifera*, Vv)、高粱(*Sorghum bicolor*, Sb)、卷柏(*Lycophyte selaginella*, Ls)

Figure 1 Phylogenetic analysis of HMA5. * is the homologous gene of HMA5 in *Medicago truncatula*. Species selected for phylogenetic analysis: *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Cucumis sativus* (Cs), *Populus trichocarpa* (Pt), *Vitis vinifera* (Vv), *Sorghum bicolor* (Sb), and *Lycophyte selaginella* (Ls)

导(图2(a)); *MTR_5g010420*在整个共生过程中都受到接种根瘤菌的显著诱导, 在28 dpi表达量最高(图2(b)); *MTR_8g012390*在共生中期和后期表达量较高, 在28 dpi受到强烈诱导, 但其他检测时期与未接种对照相比没有太大差异(图2(c)). *MTR_5g010420*和*MTR_8g079250*接菌后的表达量上调明显, 推测其与共生关系更为密切.

根据前期实验所知, 低浓度Cu^{2+}(50 mg/kg)促进苜蓿的生长和共生结瘤、高浓度Cu^{2+}(200 mg/kg)抑制植株的生长与根瘤形成, 因此选取这两个浓度对蒺藜苜蓿进行处理. qRT-PCR检测不同Cu^{2+}浓度处理下蒺藜苜蓿根中*MTR_8g079250*、*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*的表达情况. 在加铜时, *MTR_8g079250*在5和10 dpi的表达均下调, 但在200 mg/kg铜胁迫时, *MTR_8g079250*在结瘤后期表达上调(图2(d)); 无论低浓度还是高浓度铜处理, *MTR_5g010420*表达均下调(图2(e)); 低浓度铜处理时, *MTR_8g012390*的表达与对照相比没有明显区别, 高浓度铜处理时, *MTR_8g012390*表达在10及28 dpi下调, 在23 dpi有所上调(图2(f)). 这说明, 在蒺藜苜蓿共生结瘤过程中, 3个基因在对不同浓度铜离子的响应中可能发挥着不同作用, 其中*MTR_8g079250*可能和长期(结瘤后期)过量铜胁迫相关. 结合与共生的关系, 选定*MTR_8g079250*为研究的目的基因.

2.3 *MTR_8g079250*基因的亚细胞定位

在CaMV35S启动子的控制下表达绿色荧光蛋白(GFP)标记的*MTR_8g079250*. 通过基因枪转化法将质粒转入洋葱表皮细胞. GFP空载体作为对照. 在表达GFP标记的*MTR_8g079250*的细胞中, 绿色荧光主要出现在细胞膜和细胞核上(图3(a)); 在表达GFP::MTR_8g079250的本氏烟草叶片中也发现了类似的结果(图3(b)), 说明目的基因*MTR_8g079250*主要定位于细胞膜和细胞核, 其作用可能与物质的转运及信号传递相关.

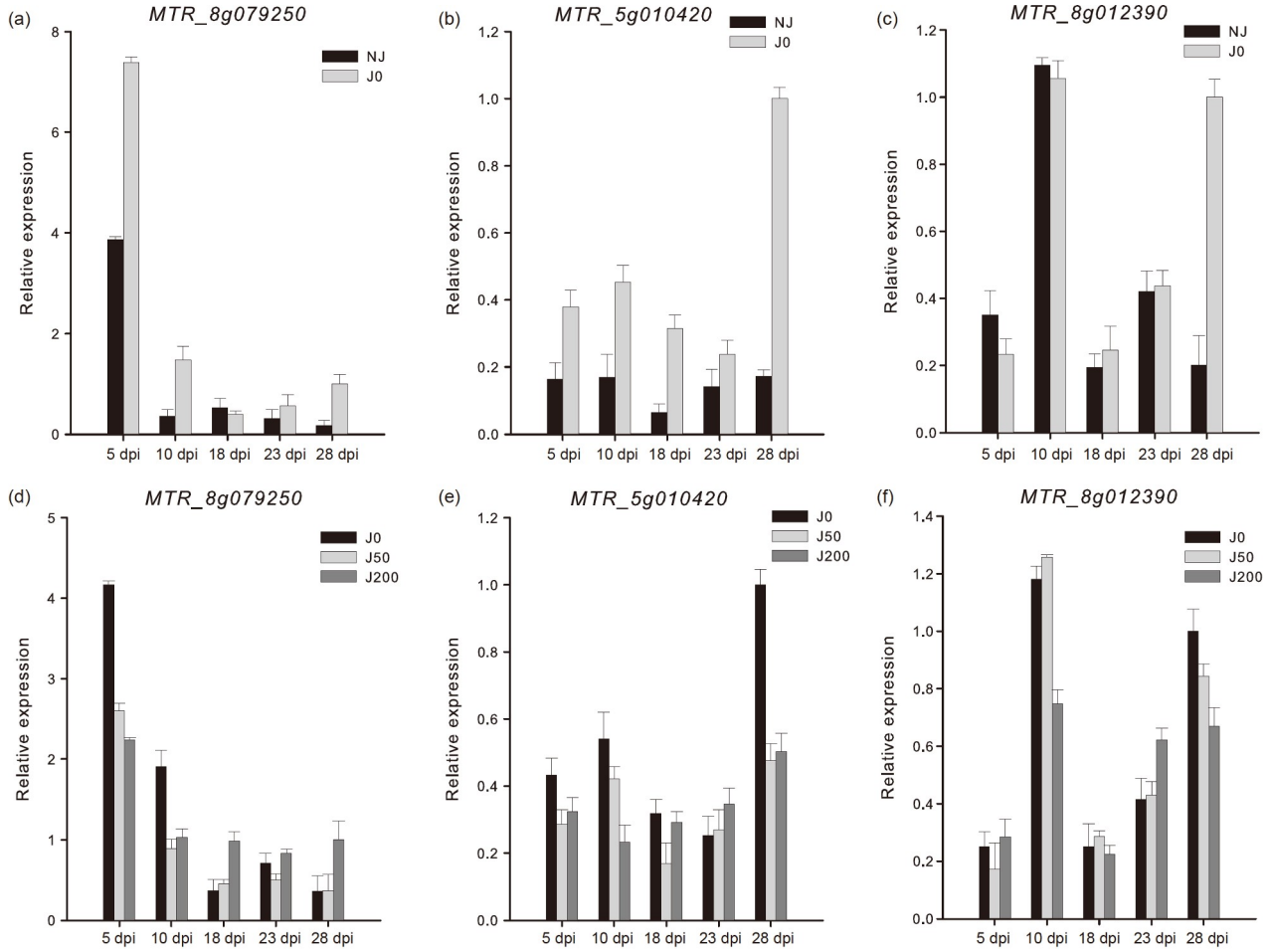


图 2 蒺藜苜蓿HMA5基因的表达水平. (a)~(c) 蒺藜苜蓿HMA5基因在共生和非共生条件下的表达水平. (d)~(f) 蒺藜苜蓿HMA5基因在不同铜浓度下的表达水平. NJ为不接种根瘤菌处理, J0为接种根瘤菌不加铜处理, J50为接种根瘤菌加50 mg/kg铜处理, J200为接种根瘤菌加200 mg/kg铜处理

Figure 2 The *Medicago truncatula* HMA5 gene expression level. (a)–(c) The expression level of HMA5 gene in *Medicago truncatula* under symbiotic and non-symbiotic conditions. (d)–(f) The expression level of HMA5 gene in *Medicago truncatula* under different Cu concentrations. NJ means no inoculation of rhizobia, J0 means inoculation of rhizobia without Cu treatment, J50 means inoculation of rhizobia with 50 mg/kg Cu treatment, and J200 means inoculation of rhizobia with 200 mg/kg Cu treatment

2.4 *MTR_8g079250*的组织表达

用*MTR_8g079250*的自身启动子连接GUS报告基因, 构建融合表达载体, 通过发根转化法转入蒺藜苜蓿根部, 取接种根瘤菌后28 d的转化植株根及根瘤染色观察, 在整个根瘤原基、成熟根瘤的顶端分生区、侵染区及外围皮层组织中可见蓝色. 观察侧根根尖、主根根尖以及根成熟区等部位, 发现根的中柱和根冠被染成蓝色(图4). 因此推测*MTR_8g079250*参与根部铜离子在维管组织以及新生组织中的转运.

2.5 *MTR_8g079250*在共生中的功能分析

为了研究*MTR_8g079250*在共生结瘤中的作用, 采用RNAi抑制其表达, 构建RNA干扰重组质粒电转入发根农杆菌Arqua1, 发根转化蒺藜苜蓿. 检测GUS基因在转化植株根部的表达, 验证转化成功. RT-PCR和qRT-PCR检测, 结果与对照相比, 干扰植株根部目的基因的表达量下调40%(图S1).

将转化植株转入珍珠岩和蛭石的混合培养基中培养3 d后接种lac Z标记的根瘤菌, 7 d后染色观察, 分析侵染情况(图5). 与对照组相比, 干扰植株的根毛卷曲及侵染线没有差异, 皮层侵染线和根瘤原基稍有增多. 观察接菌后28 d的转化植株, 发现RNAi-1植株与对照相比无明显差异, RNAi-2植株侧根较多, 根瘤较多且略有增大, 颜色更深. RNAi-1在株高、根长、鲜重及根

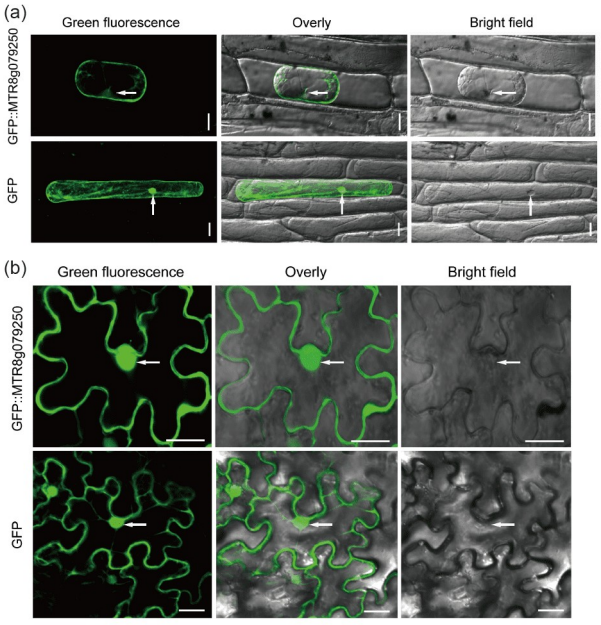


图 3 (网络版彩色)GFP::MTR_8g079250融合蛋白的亚细胞定位. (a) GFP::MTR_8g079250融合蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位, GFP空载体作对照, 标尺为50 μm. (b) GFP::MTR_8g079250融合蛋白在烟草叶片细胞中的亚细胞定位, GFP空载体作对照, 标尺为50 μm. 箭头所指处为细胞核

Figure 3 (Color online) Subcellular localization of the GFP::MTR_8g079250. (a) Subcellular localization of GFP::MTR_8G079250 in onion epidermal cells. GFP empty vector is as control with a scale of 50 μm. (b) Subcellular localization of GFP::MTR_8G079250 in tobacco leaf cells. GFP empty vector is as control with a scale of 50 μm. The arrow points to the nucleus

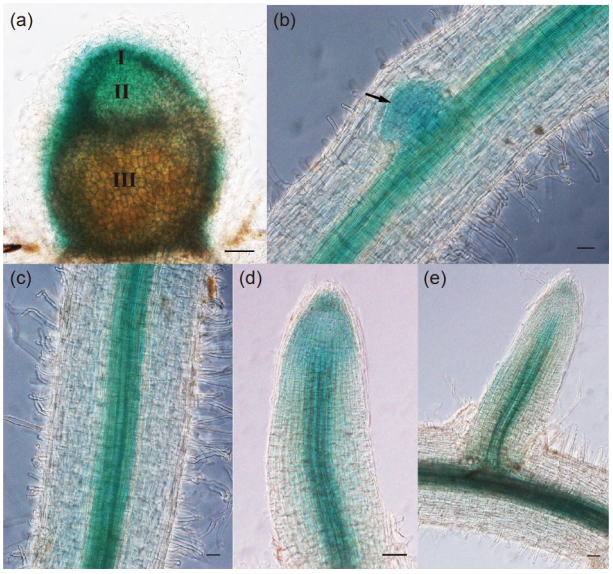


图 4 (网络版彩色)pMTR_8g079250::GUS融合蛋白在蒺藜苜蓿根及根瘤中的表达. (a), (b) pMTR_8g079250::GUS在根瘤和根瘤原基中的表达, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别表示顶端分生组织、侵染区、固氮区, 箭头指示根瘤原基. (c) pMTR_8g079250::GUS在根成熟区的表达. (d), (e) pMTR_8g079250::GUS在主根根尖和侧根根尖中的表达. 标尺为200 μm

Figure 4 (Color online) Expression of pMTR_8G079250::GUS in roots and nodules of Medicago truncatula. (a), (b) Expression of pMTR_8G079250::GUS in nodules and nodule primordial. Ⅰ is the apical meristem, Ⅱ is infection zone, and Ⅲ is nitrogen fixation zone. The arrows indicate the nodule primordia. (c) pMTR_8g079250::GUS expression in the root maturation zone. (d), (e) pMTR_8G079250::GUS expression in the root tips of principal root and lateral roots. Scale is 200 μm

瘤数目等方面无明显差异; RNAi-2虽在鲜重和根瘤数目上有所增加, 但差异均不显著(图S2).

接菌28 d后观察根瘤的超微结构, 结果显示, RNA干扰转化植株的根瘤侵染细胞中类菌体与对照植株相比无明显差异(图S3). qRT-PCR检测RNA干扰转化植株根部的基因表达量, 发现*NIN*表达量上升; 接菌5 d后, *ENOD11*的表达量有所上升(图S4(a)).

*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*是*MTR_8g079250*的同源基因. 对干扰植株中这两个同源基因的表达量进行检测发现, 在干扰转化根中, *MTR_8g012390*表达均上调, *MTR_5g010420*略有上调或下调(图S4(c)).

已有研究表明, 拟南芥乙烯信号传导通路中所必需的铜离子由ATX1转运给HMA7/RAN1, 同时, 两个

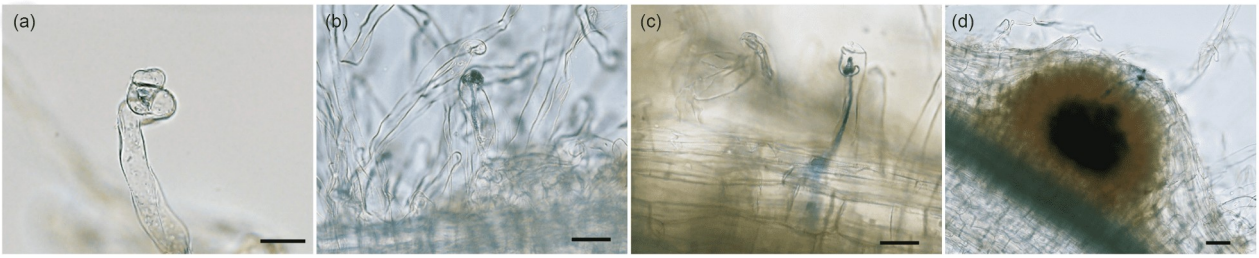


图 5 (网络版彩色)接种根瘤菌7 d后*MTR_8g079250* RNAi与过表达转化植株中的侵染事件观察. (a) 根毛卷曲; (b) 根毛侵染线; (c) 皮层侵染线; (d) 根瘤原基. 标尺为100 μm

Figure 5 (Color online) Infection events of *MTR_8g079250* RNAi and overexpressed transgenic plants at 7 dpi. Root hair curling (a), infection threads (ITs) in root hair (b) or in the cortex (c), and nodule primordia (d). Scale is 100 μm

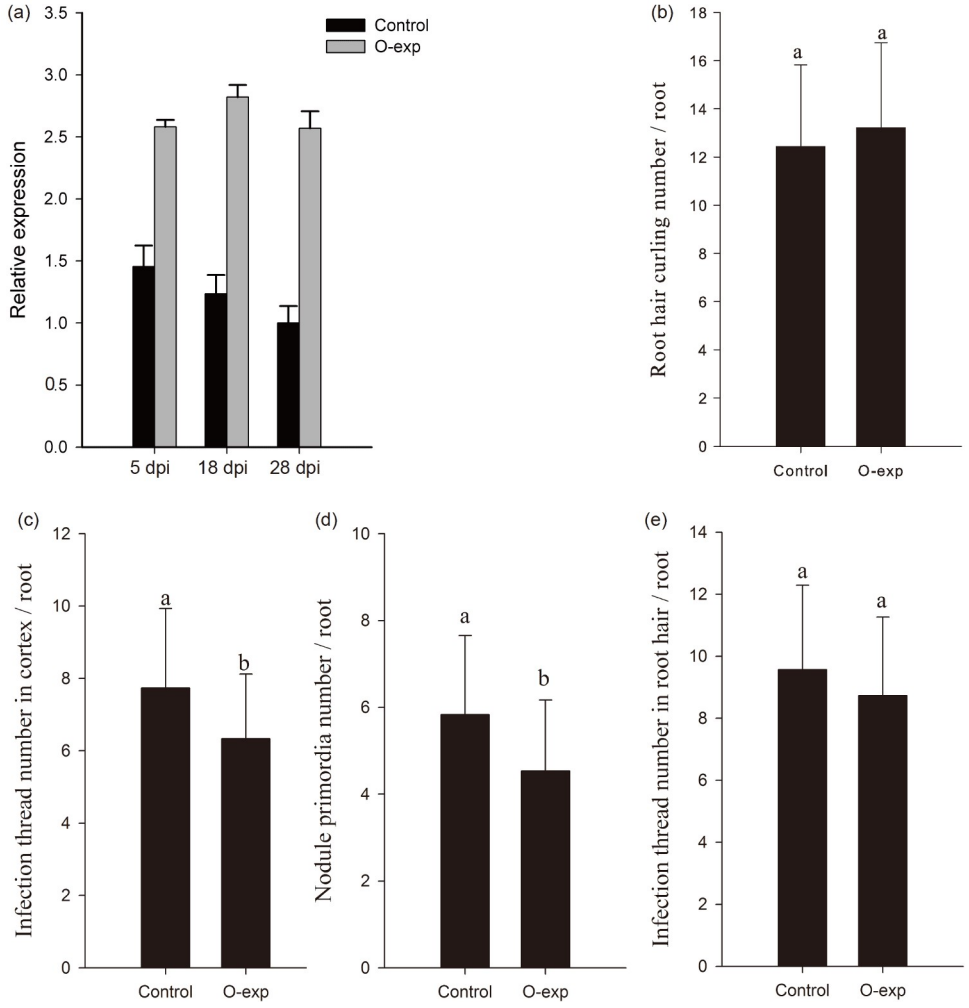


图 6 *MTR_8g079250*在过量表达植株中的表达. (a) qRT-PCR分析*MTR_8g079250*在接菌后5、18和28 d的蒺藜苜蓿转化根中的表达水平, 以蒺藜苜蓿的*Actin* rDNA的表达水平进行标准化, 误差棒显示为标准误, 设置3个重复. (b)~(e) 接菌28 d后的过量表达转化植株侵染事件统计: (b) 根毛卷曲; (c) 皮层侵染线; (d) 根瘤原基; (e) 根毛侵染线. 数值表示平均值, 误差棒显示为标准差, 样本容量为30株植物, *t*检验, $P<0.05$, 不同的字母表示具有显著性差异

Figure 6 Infection events of *MTR_8G079250* expressioned transgenic plants. (a) qRT-PCR analysis of the expression levels of *MTR_8g079250* in 5, 18 and 28 dpi transformed roots, with *Actin* rDNA in *Medicago truncatula* as the endogenous control. Data are presented as the mean ± SE, with three replicates. Numbers of root hair curlings (b), ITs in root hair (e) or in cortex (c) and nodule primordial (d) per root of the control and *MTR_8G079250*-overexpressioned plants. The data were collected from 30 independent hairy root systems in each group of plants. Data are presented as the mean ± E. Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$, Student-*t* test)

铜离子伴侣蛋白ATX1和CCH分别与HMA5互作[19]. 因此推测, 在植物中铜离子是由HMA5经ATX1和CCH传递给HMA7/RAN1, 最终将铜离子转运给乙烯受体. 通过比对和预测, *MTR_4g094695*和*MTR_2g035840*与HMA7/RAN1家族的相似性最高, 铜离子伴侣*MTR-1g092670*与CCH相似度最高. qRT-PCR检测了蒺藜苜蓿RNA干扰植株中铜离子伴侣和HMA7/RAN1基因的表达情况. 在干扰植株中*MTR_4g094695*、*MTR_2g035840*和*MTR_1g092670*的表达量均无明显变化(图S4(b)).

在*MTR_8g079250*的干扰实验中, 通过观察侵染事件和根瘤超微结构发现, 与对照相比, 差异不明显, 因此推测可能存在基因的功能冗余. 为更进一步探究*MTR_8g079250*在共生结瘤进程中的功能, 对其进行了过量表达.

构建过表达重组质粒电转入发根农杆菌感受态Arqua1, 转化蒺藜苜蓿. RT-PCR显示, 转化植株根部目的基因表达量上调一倍多. 根毛卷曲数目与对照组无

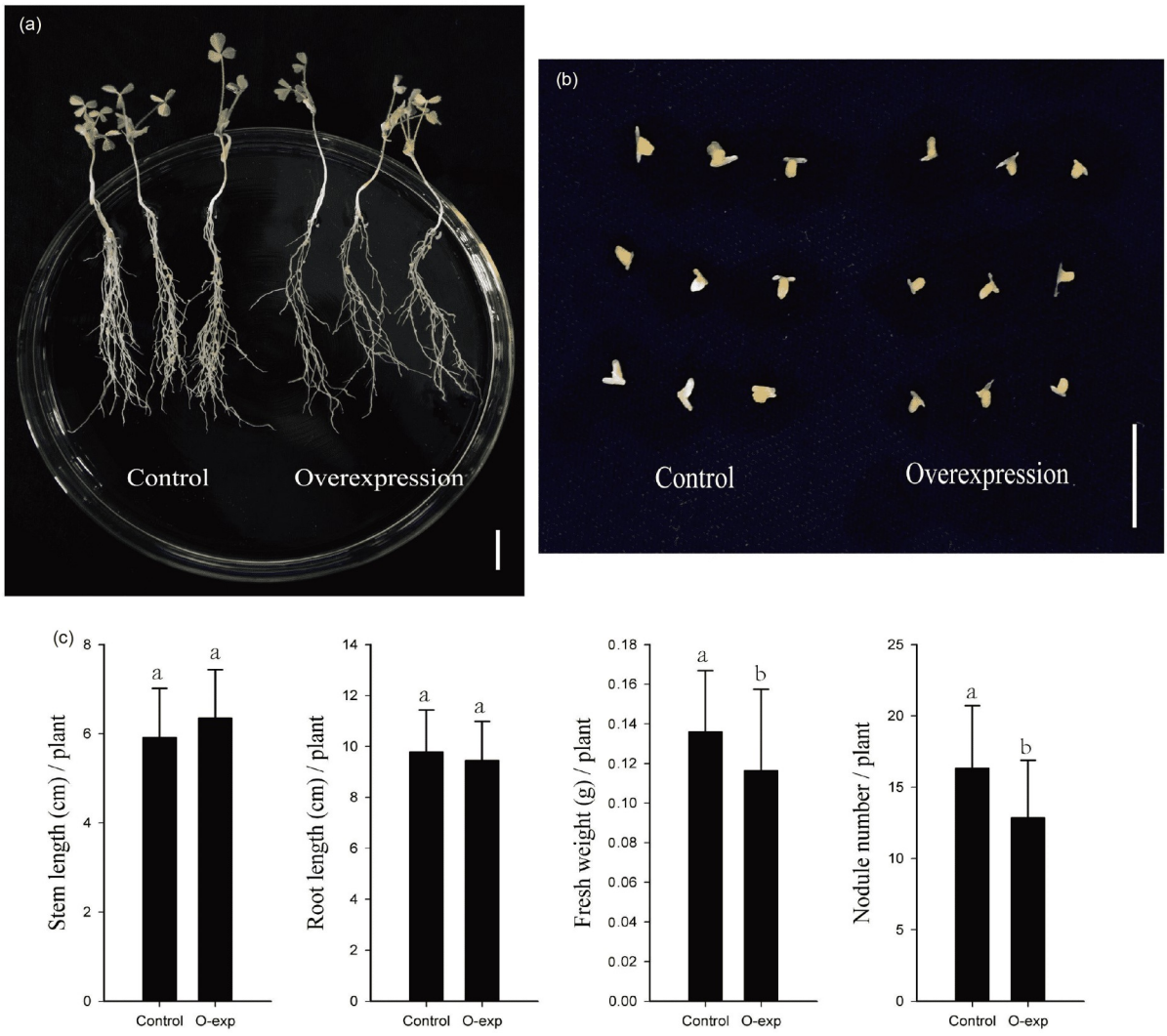


图 7 (网络版彩色)接种根瘤菌28 d后过量表达*MTR_8g079250*转化植株的生长表型及生理指标统计. (a) 转化植株表型. 标尺为1 cm. (b) 转化植株根瘤表型, 标尺为1 cm. (c) 转化植株的生理指标统计: 依次为株高、根长、鲜重、根瘤数. 误差棒显示为标准差, 样本容量为30株植物, 不同的字母表示具有显著性差异, *t*检验, $P<0.05$

Figure 7 (Color online) *MTR_8g079250*-overexpressing (O-exp) transgenic plant growth phenotypes and nodulation after inoculation at 28 dpi. (a) Transgenic plants. Scale bar = 1 cm. (b) Nodules phenotypes. Scale bar = 1 cm. (c) The lengths of stems and roots, fresh weight and number of nodules were scored at 28 dpi. The numbers of independent hairy root systems scored are 30 for each construct. Data are presented as the mean±E. a and b above the bars indicate significant differences ($P<0.05$, Student-*t* test)

差异, 根毛侵染线、皮层侵染线和根瘤原基的数目均有所减少, 其中皮层侵染线和根瘤原基的数目显著减少(图6). 过表达植株叶片发黄, 侧根稀疏, 根瘤较小, 根瘤数目与植株鲜重明显减少(图7). 透射电子显微镜观察根瘤超微结构发现, 对照根瘤中被侵染的细胞中类菌体排列紧密, 数目较多, 形状规则. 而过量表达转化植株的根瘤受侵染细胞中类菌体稀疏, 数目较少, 环类菌体空间明显扩大, 甚至出现类菌体被降解后的空胞, 说明根瘤开始衰老(图8).

qRT-PCR检测根中相关基因, 发现在接菌后不同时期, 与根瘤形成相关基因的表达均有不同程度的下降, 这与根瘤数减少的现象一致; 与成熟根瘤固氮功能相关的豆血红蛋白的表达量也有所下调(图9(a)).

对*MTR_8g079250*的同源基因*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*进行检测发现, 过表达植株中, *MTR_5g010420*表达量略有上调, *MTR_8g012390*略有下调(图9(c)), 推测*MTR_8g079250*过量表达不会引起另外两个同源基因的转录变化, 即使有, 影响也较小.

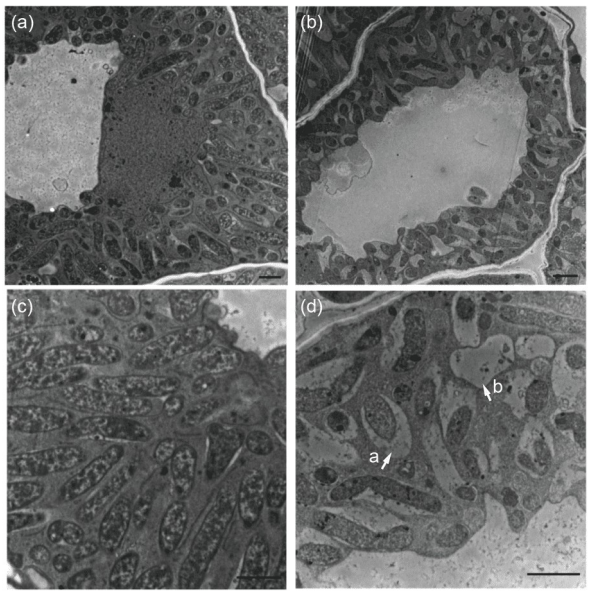


图 8 过量表达转化植株根瘤透射电子显微镜观察. (a), (c) 空载体对照; (b), (d) 过量表达. 箭头所示a为环类菌体空间增大, b为空胞, 标尺为2 μm

Figure 8 TEM micrographs of *MTR_8g079250*-overexpressing nodules at 28 dpi. (a), (c) Control; (b), (d) *Rpf84*-overexpressing plants. Arrow a shows the space increase of the cycloids, and arrow b shows empty cell. Scale bars = 2 μm

对HMA7/RAN1的同源基因和CCH的同源基因进行表达检测发现, 过表达植株中*MTR_4g094695*及CCH同源基因的表达无明显变化; *MTR_2g035840*表达量上调一倍以上(图9(b)). 这说明*MTR_8g079250*基因过量表达可能诱导了*MTR_2g035840*基因的表达, 推测蒺藜苜蓿中HMA5家族基因与HMA7/RAN1家族基因在功能上有一定的相关性.

3 讨论

水稻中的9个HMA家族成员中有5个已经得到了较为详细的研究. 其中, OsHMA5定位在质膜上, 参与将铜转运到根和其他器官的木质部[20]. 双子叶模式植物拟南芥中HMA家族中的所有成员均已进行了功能鉴定和分类. AtHMA5被发现参与Cu由根部到茎部的转运以及根部的解毒[12,18]. 在黄瓜基因组中鉴定出了8个假定的HMA家族成员[21]. 其中, CsHMA5.1和CsHMA5.2是对铜高度亲和的转运体, 定位在液泡膜上, CsHMA5.2可以将Cu隔离在液泡中从而行使解毒功能[22].

近年来, 对豆科植物HMA5基因的研究鲜见报道. 本研究主要对豆科模式植物蒺藜苜蓿中HMA5基因的同源基因*MTR_8g079250*在根瘤形成过程中的功能进行了初步探索. 表达分析显示, 在铜胁迫时, 接菌18 d后*MTR_8g079250*的表达量上升, 在接菌28 d时上调明显. 已有研究表明, 拟南芥和黄瓜中的HMA5都具有解毒功能, 因此可以推测在蒺藜苜蓿中过量铜处理时, 结瘤后期*MTR_8g079250*的表达上调可能也与解毒有关.

对水稻和黄瓜中的HMA5基因表达分析显示, OsHMA5主要在根维管束细胞和节间弥散性维管束的木质部区域以及花序梗、轴和壳的维管束组织中表达, 定位在质膜上[20]; 黄瓜CsHMA5.1和CsHMA5.2均定位在液泡膜上, CsHMA5.1只在根部表达, CsHMA5.2则在根、下胚轴、子叶、叶柄和叶片等组织中均有表达[22]. 拟南芥AtHMA5主要在根和花中表达, 但在细胞和组织中的具体表达部位尚不明确[12,18]. 类似地, 本研究对*MTR_8g079250*进行组织定位检测, 发现其主要在根的维管组织及根瘤分生区、侵染区和外围皮层组织中表达, 另外在新生根瘤原基中也有表达. 然而, 亚细胞定位显示, *MTR_8g079250*除了定位于质膜外, 在细胞核中也有表达. 这与水稻和黄瓜中HMA5同源基因的定位情况有所不同, 表明在不同植物中HMA5可能具有不同的表达模式, 行使着不同的功能.

对*MTR_8g079250*进行RNA干扰和过量表达研究, 以此探究它们在蒺藜苜蓿与根瘤菌共生固氮中的功能. 结果发现, *MTR_8g079250*的RNA干扰植株与对照植株相比, 在根瘤菌侵染过程、生理表型、根瘤显微结构和相关基因表达方面没有显著差异, 说明干扰*MTR_8g079250*对根瘤菌共生固氮没有明显影响. 前文所说蒺藜苜蓿有3个HMA5同源基因: *MTR_8g079250*、*MTR_5g010420*和*MTR_8g012390*, 推测3个基因的功能存在冗余, 在干扰*MTR_8g079250*后, 其他两个同源基因的功能对其起到弥补作用; 同时, 也不排除*MTR_8g079250*对共生过程的影响可能是间接的. 过表达*MTR_8g079250*的植株与对照组相比, 皮层侵染线、根瘤原基及根瘤的数量明显减少, 结瘤标志性基因*DMI1*、*NIN*、*ENOD11*和豆血红蛋白都发生了不同水平的下调, 说明*MTR_8g079250*的过量表达抑制了根瘤菌的侵染过程及根瘤发育. 同时, 透射电子显微镜观察结果显示, 过表达根瘤内侵染细胞的类菌体呈现降解的状态, 预示根瘤早衰, 这些都说明过表达*MTR_8g079250*对结瘤有抑制作用. 接种28 d后过表达植株的叶片泛黄, 侧根减少, 鲜重下降, 推测目的基因

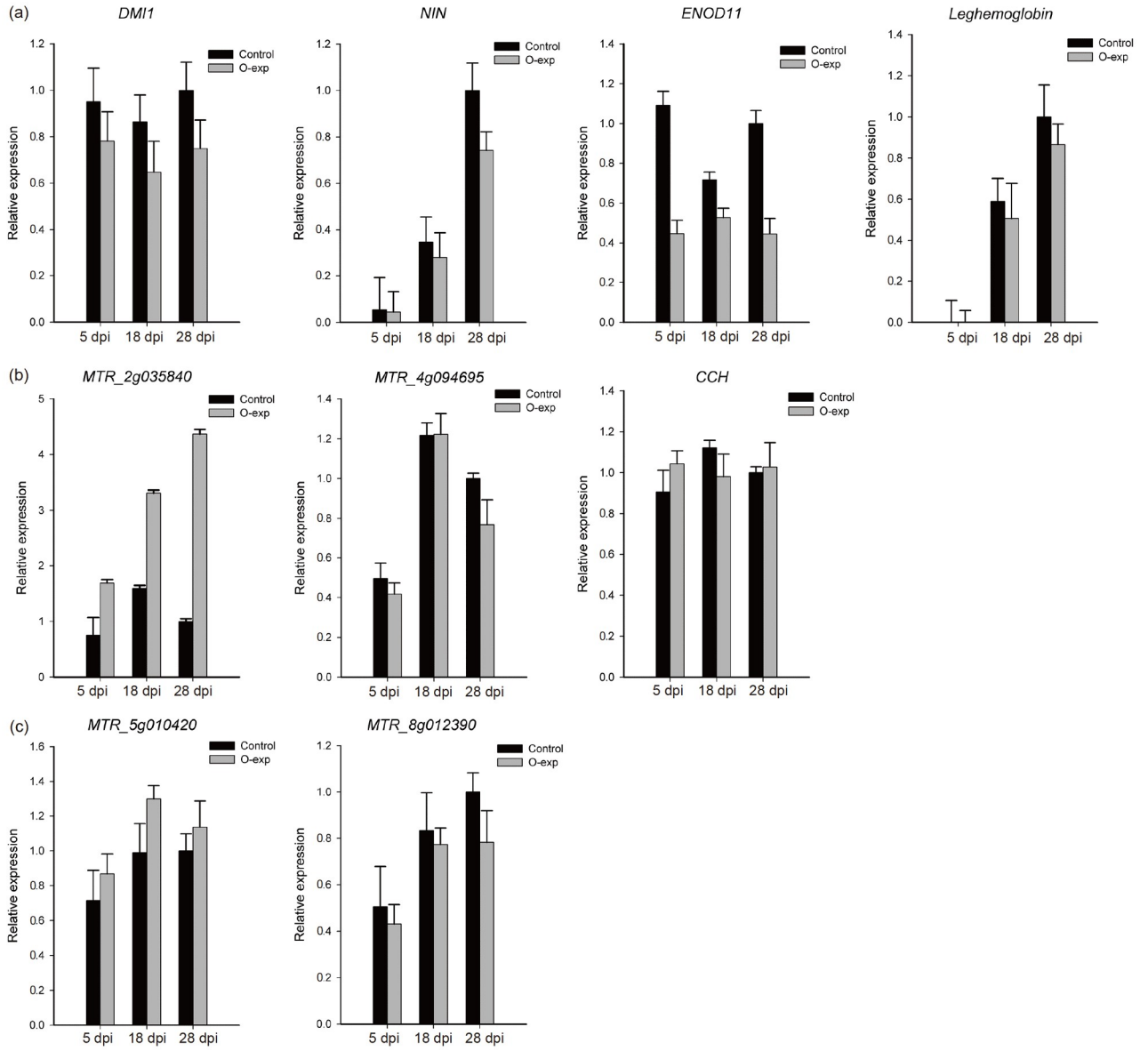


图 9 定量PCR分析*MTR_8g079250*过量表达转化植株中结瘤和铜转运相关基因的表达. (a) 结瘤相关基因的定量分析. (b) HMA7/RAN1同源基因和CCH同源基因的定量分析. (c) HMA5同源基因的定量分析. 以*Actin*的表达量进行标准化. 误差棒显示标准误, 设置3个重复

Figure 9 qPCR analysis of the expression levels of genes related to nodulation and Cu transport in the *MTR_8G079250*-overexpressed transgenic plants. (a) Quantitative analysis of nodule-related genes. (b) Quantitative analysis of HMA7/RAN1 homologues genes and CCH homologues genes. (c) Quantitative analysis of HMA5 homologous genes, standardized by *Actin* expression. Data are presented as the mean±SE

过量表达后可能影响了植物自身铜离子的内稳态, 从而影响了植株的正常生长.

已有研究表明, 乙烯调控根毛对结瘤因子响应的敏感性[23]; 干扰钙信号, 调节着表皮侵染线进入皮层的数量[24]; 同时, 与根瘤的起始定位有关[25,26]. 在拟南芥中, 乙烯首先被乙烯受体识别, 乙烯受体蛋白需要与铜离子结合后才能发挥作用. 而铜离子具有激发子活性, 能够激活乙烯合成关键基因ACS表达, 增强拟南芥的抗病性[27], 是乙烯信号传导所必需的. 拟南芥AtHMA7能够将Cu转运给乙烯受体并且参与维持幼苗中的Cu稳态[28~30]. 而乙烯又可以通过调节结瘤因子的信号传导来调控共生结瘤. 铜分子伴侣CCH和ATX1蛋白都可以与HMA5的N端互作[31]. ATX1可以将铜离子运输到HMA7/RAN1[19], 因此我们推测, 植物中HMA5先将铜离子传递给ATX1和CCH, 再传递给HMA7/RAN1, 最后转运到乙烯受体. *MTR_8g079250*过表达的蒺藜苜蓿共

生根中，HMA7/RAN1基因*MTR_2g035840*表达水平明显上调，说明*MTR_8g079250*可能通过影响细胞中与铜离子相关的乙烯信号通路参与共生结瘤的调控. 另外，由于铜离子是众多共生结瘤过程相关酶的辅因子，*MTR_8g079250*也有可能直接影响了这些酶的活性，进而调控共生结瘤. 目前，没有直接的证据表明蒺藜苜蓿HMA5对共生结瘤的影响与乙烯信号通路有关. 这些问题还有待进一步探索.

参考文献

1 Johnston A W, Yeoman K H, Wexler M. Metals and the rhizobial-legume symbiosis—Uptake, utilization and signalling. Adv Microb Physiol, 2001, 45: 113−156

2 Saito Y. Compatibility of mixed seedings of tropical legumes and grasses on a south american tropical savanna. Jarq-Jpn Agric Res Q, 2004, 38: 61–67

3 Górskaczekaj M, Borucki W. A correlative study of hydrogen peroxide accumulation after mercury or copper treatment observed in root nodules of Medicago truncatula under light, confocal and electron microscopy. Micron, 2013, 53: 24−32

4 Rees E M, Thiele D J. From aging to virulence: Forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. Curr Opin Microbiol, 2004, 7: 175–184

5 Chen D. Identification of biomarkers and copper binding proteins in Tilapia and Zebrafish by Proteomics Approaches. Doctor Dissertation. Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong (Hong Kong), 2010

6 Argüello J M, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. Biometals, 2007, 20: 233

7 Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, et al. The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. Plant J, 2006, 45: 225−236

8 Williams L E, Mills R F. P1B-ATPases—An ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. Trends Plant Sci, 2005, 10: 491–502

9 Kim Y Y, Choi H, Segami S, et al. AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. Plant J Cell Mol Biol, 2010, 58: 737–753

10 Moreno I, Norambuena L, Maturana D, et al. AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca^{2+}/heavy metal pump. J Biol Chem, 2008, 283: 9633–9641

11 Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. J Biol Chem, 2006, 281: 2882–2892

12 Zhang Y, Chen K, Zhao F J, et al. OsATX1 interacts with heavy metal P1B-type ATPases and affects copper transport and distribution. Plant Physiol, 2018, 178: 329−344

13 Huang X Y, Deng F, Yamaji N, et al. A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. Nat Commun, 2016, 7: 12138

14 Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubinska E, et al. Molecular and biochemical properties of two P_{1B2}-ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. Plant Cell Environ, 2015, 38: 1127−1141

15 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Methods, 2001, 25: 402–408

16 Burkhead J L, Reynolds K A G, Abdel-Ghany S E, et al. Copper homeostasis. New Phytol, 2009, 182: 799−816

17 Grotz N, Guerinot M L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res, 2006, 1763: 595–608

18 Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, et al. Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-Type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2008, 148: 969−980

19 Li W, Lacey R F, Ye Y, et al. Triplin, a small molecule, reveals copper ion transport in ethylene signaling from ATX1 to RAN1. PLoS Genet, 2017, 13: e1006703

20 Deng F, Yamaji N, Xia J, et al. A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. Plant Physiol, 2013, 163: 1353–1362

21 Huang S, Li R, Zhang Z, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat Genet, 2009, 41: 1275–1281

22 Migocka M, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubinska E, et al. Functional and biochemical characterization of cucumber genes encoding two copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. J Biol Chem, 2015, 290: 15717−15729

23 Oldroyd G E D, Engstrom E M, Long S R. Ethylene inhibits the nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. Plant Cell, 2001, 13: 1835–1849

24 Penmetsa R V, Cook D R. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. Science, 1997, 275: 527−530

25 Heidstra R W, Yang W C, Yalcin Y, et al. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in Rhizobium-legume interaction. Development, 1997, 124: 1781−1787
26 Penmetsa R V, Frugoli J A, Smith L S, et al. Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. Plant Physiol, 2003, 131: 998–1008
27 Xu M M, Xue X J, Yu Y, et al. Copper ion activates ethylene to inhibit abscisic acid synthesis and enhance potato disease resistance (in Chinese). In: Proceedings of the 2019 Chinese Crop Society Annual Conference, 2019 [许铭铭, 薛晓婧, 于悦, 等. 铜离子激发乙烯抑制脱落酸合成增强马铃薯的抗病性. 见: 2019年中国作物学会学术年会会议论文集, 2019]
28 Binder B M, Rodríguez F I, Bleecker A B. The copper transporter RAN1 Is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 2010, 285: 37263–37270
29 Hirayama T, Kieber J J, Hirayama N, et al. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. Cell, 1999, 97: 383–393
30 Woeste K E, Kieber J J. A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. Plant Cell, 2000, 12: 443–455
31 Puig S, Mira H, Dorcey E, et al. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354: 385−390

补充材料

图S1 qRT-PCR分析*MTR_8g079250*在接菌后5、18和28 d的蒺藜苜蓿转化根中的表达水平
图S2 接菌后28 d的RNAi转化植株侵染事件统计
图S3 接菌后28 d的RNAi植株根瘤透射电子显微镜观察
图S4 定量PCR分析*MTR_8g079250* RNAi转化植株中结瘤和铜转运相关基因的表达

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “蒺藜苜蓿重金属转运蛋白HMA5基因在共生结瘤中的功能分析”

Functional analysis of heavy metal transporter HMA5 gene in symbiotic nodulation of *Medicago truncatula*

Mo Yang†, Mingying Xu†, Lu Zhang & Minxia Chou*

Shaanxi Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: minxia104@nwafu.edu.cn

Leguminous plants are able to grow in a nitrogen-deprived environment because they have evolved a symbiotic relationship with rhizobia in the soil, leading to the formation of new organs, namely nodules. In root nodules, rhizobia reduce nitrogen to ammonia through biological nitrogen fixation and provide ammonia to the host legumes in exchange for carbon source and energy they need. In the symbiosis, legumes also provide the metal trace elements to rhizobia, including copper (Cu). As one of the essential elements for plant growth, Cu participates in multiple biological processes. However, excess Cu induces oxidative stress to the detriment of many physiological processes including symbiotic nitrogen fixation. Therefore, the copper content in plants must be maintained within a certain physiological range. The higher plants have evolved complex physiological mechanisms to maintain the copper homeostasis in cells. The heavy metal transporter, P-type ATPase (HMA), is mainly involved in the transport of heavy metals including copper in plants. All members of the HMA family in the dicot model plant *Arabidopsis* have been identified and classified. Preliminary research in the laboratory found that HMA5 gene is related to copper stresses and the symbiotic nodulation of *Medicago*. In this study, the function of HMA5 homologous gene was investigated during symbiotic nodulation in *Medicago truncatula* (Mt), a model leguminous plant.

A phylogenetic tree was constructed based on the currently classified HMA family genes in Medicago truncatula and the expression patterns of the genes were analyzed. A homologous gene *MTR_8g079250* of HMA5 was selected for further study. Subcellular localization assays showed that *MTR_8g079250* was localized to the cell membrane and nucleus. The fusion expression analysis of GFP::MTR_8g079250 showed that MTR_8g079250 was mainly expressed in the meristem, infection zone and cortex of the nodules, as well as in the stele and cap of the roots. Knockdown of *MTR_8g079250* by RNA interference (RNAi) technology had no significant effect on the symbiotic nitrogen fixation phenotype. However, overexpression of *MTR_8g079250* impaired the infection process and nodule development. Compared with the control, the fresh weight and nodule number per plant were dramatically reduced in *MTR_8g079250*-overexpression plants. The numbers of the infection threads and nodule primordia were also significantly decreased. Ultrastructure analyses showed that the nodule cells contained fewer bacteria in the overexpression plants. In particular, the remarkable deformation of bacteroids and enlargement of peribacteroid space occurred in the infected cells, suggesting premature aging of the nodules. qRT-PCR analyses showed that the expression levels of the nodulation marker genes, *NIN*, *DMI1*, *ENOD11* and leghemoglobin gene were down-regulated to different extent. These results indicate that the overexpression of *MTR_8g079250* inhibited the symbiotic nodulation.

In summary, this study preliminarily assessed the function of HMA5 in symbiotic nodulation, laying a foundation for the subsequent exploration of the absorption, transport and equilibrium mechanisms of copper ions during root nodule symbiosis.

***Medicago truncatula*, HMA5, symbiotic nitrogen fixation, localization analysis, overexpression**

doi: 10.1360/TB-2021-0164