

豆科植物共生结瘤的分子基础和调控研究进展

丑敏霞^{1*} 魏新元²

¹西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100

摘要 豆科植物与根瘤菌共生互作的结果导致了一个新的植物器官——根瘤的形成, 根瘤菌生活在根瘤中, 它们具有将氮气转化为能被植物同化的氨的能力。该文阐述了根瘤的形成过程和类型, 并主要以模式豆科植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)和日本百脉根(*Lotus japonicus*)为例, 对近年来共生结瘤过程中宿主植物对根瘤菌结瘤因子的识别和信号传递、侵入线形成和固氮的分子基础, 以及宿主植物对根瘤形成的自主调控机制、环境中氮素营养对结瘤的影响研究进行了综述, 指出当前豆科植物与根瘤菌共生互作研究存在的问题, 并对今后的研究方向作了分析与展望。

关键词 豆科植物, 根瘤形成, 结瘤素基因, 信号传递, 共生固氮

Review of research advancements on the molecular basis and regulation of symbiotic nodulation of legumes

CHOU Min-Xia^{1*} and WEI Xin-Yuan²

¹College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; and ²College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract

The symbiosis between leguminous plants and rhizobia leads to the formation of a novel root organ, the nodule. In mature nodules, rhizobia provide the host plant with ammonium, which is produced through bacterial nitrogen fixation. The symbiotic interactions involve the perception of bacterial signaling factors called Nod factors (NFs) by plant host, the NF signaling pathway, the formation of infection threads and the development of nodule in the cortex. Although this nodule formation is beneficial for host plants to secure a nitrogen resource, overproduction of nodules could deleteriously affect plant growth. Legume plants avoid this by utilizing a negative feedback regulation known as autoregulation of nodulation (AON), in which earlier formed nodules suppress further nodulation through shoot-root communication. We summarize nodule formation and types and highlight recent studies on the molecular basis underlying NF signaling cascade, AON and effects of environmental nitrogen conditions on nodulation. We also discuss current research problems and reflect on the future of this field.

Key words legumes, nodule formation, nodulin genes, signaling, symbiotic nitrogen fixation

空气中约含80%的氮气, 因其化学惰性而无法被高等生物直接利用。只有固氮微生物具有将氮气转化为能被植物同化的氨的能力, 此即为生物固氮。据联合国粮农组织(FAO) 1995年粗略估计, 全球每年由生物固定的氮量已近 2×10^{11} kg (相当于 4×10^{11} kg尿素), 约占全球植物需氮量的3/4。所以, 生物固氮是地球上最大规模的天然氮肥加工厂。

根据固氮微生物与其他生物的关系, 可将生物固氮系统分为自生固氮、联合固氮和共生固氮3种不同的体系。其中, 共生固氮体系是自然界中主要的固氮体系, 包括根瘤菌与豆科植物、弗兰克氏菌

与非豆科植物、固氮蓝细菌与植物(如满江红(*Azolla imbricata*)、苏铁(*Cycas revoluta*)和根乃拉草(*Gunnera tinctoria*)), 以及蓝细菌与真菌的地衣共生体等, 这一体系具有根瘤等特殊的共生结构, 固氮效率极高, 因而始终是生物固氮研究的焦点之一, 其中尤以豆科植物的共生固氮最为突出。世界上有豆科植物约19 700种, 其中已知可以结瘤固氮的有2 800多种, 占15% (Dénarié & Roche, 1991)。截止2003年, 全球种植豆科植物的面积达1.8亿 hm^2 , 占地球可耕地的12%和世界主要农作物产量的27% (Graham & Vance, 2003)。它们非凡的共生固氮能力

已使其成为人类食物蛋白的一个重要来源,同时也是自然界和农业生态系统的重要氮素来源之一,它们的次生代谢产物的重要价值也日益受到关注。此外,豆科植物还能与真菌共生形成内生菌根。

豆科植物与根瘤菌共生互作的结果导致了一个新的植物器官——根瘤的形成。根瘤菌生活在根瘤中,它们具有将氮气转化为能被植物同化的氨的能力。近年来,人们对共生固氮的研究取得了长足的进展,特别是植物方面涉及共生结瘤的研究已经全面展开,主要表现在:结瘤早期重要的信号传导过程初露端倪;许多结瘤素基因从不同豆科植物中被分离筛选,部分基因的功能得以阐明;围绕模式植物**蒺藜苜蓿**(*Medicago truncatula*)和日本百脉根(*Lotus japonicus*)进行的结构、比较、功能基因组学及蛋白质组学的研究正如火如荼地展开。本文主要以**蒺藜苜蓿**和日本百脉根的各种突变株为例,对近年来豆科植物在共生固氮方面特别是共生结瘤过程中的信号传导研究进展进行了综述,并对当前存在的问题和以后的研究方向作了分析与展望,以期对豆科植物与根瘤菌的共生互作研究提供参考。

1 根瘤的形成与类型

豆科植物可以与土壤中的根瘤菌属(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)及固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)等根瘤菌共生结瘤,这些共生的革兰氏阴性菌伙伴被统称为根瘤菌,它们之间的共生互作起始于共生双方的分子对话。首先,植物分泌类黄酮至根际,诱导根瘤菌结瘤基因的表达并合成结瘤因子(Nod factor, NF)。这些结瘤因子是一些脂壳寡糖(lipochitooligosaccharides, LCOs),它们被植物特异性地识别后,植物的根迅速作出一系列反应,如钙峰及离子流(Ca^{2+} 、 Cl^- 、 H^+)的形成、根毛顶端膨胀和新的顶端生长、根毛分枝和卷曲(Dénarié *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 2000; Shaw & Long, 2003)。在卷曲的根毛内,附着的根瘤菌进入细胞壁之间并开始形成侵入线。侵入线是一个管状结构,由修饰过的植物细胞壁的局部降解及质膜内陷而成。与此同时,某些皮层细胞进行有丝分裂,根瘤原基开始形成(Timmers *et al.*, 1999)。以类似顶端生长的方式,侵入线在根毛内向前推进并穿过皮层细胞,最后在

根瘤原基细胞中释放根瘤菌,后者进一步分化成被膜包围着的可以固氮的类菌体,共生体形成,根瘤原基逐渐发育为根瘤(van Brussel *et al.*, 1992; van Spronsen *et al.*, 1994; Brewin, 1998)。

结瘤因子主要由3–5个 β -1,4糖苷键连接的乙酰氨基葡萄糖寡聚体骨架和非还原端脂肪酸链组成,其侧链上羟基的取代基团、脂酰链的长度及不饱和度决定着NF的活性和特异性,并与根瘤菌的宿主专一性紧密相关。有效的共生侵入需要特殊取代基团的存在,但这些取代基团并非对NF诱导的所有反应都是必需的。例如,在**蒺藜苜蓿**与中华根瘤菌的共生互作中,侵入线的形成严格要求结瘤因子葡萄糖胺骨架非还原端具有乙酰基,但钙峰形成、一些特异基因的转录及根瘤原基的发生则没有这样严格的要求(Ardourel *et al.*, 1994; Oldroyd *et al.*, 2001; Wais *et al.*, 2002)。因此,有人提出了在**Medicago**中NF存在两类受体:信号受体与进入受体,前者是诱导结瘤过程早期反应所必需的,后者则介导着根瘤菌在根表皮中的侵入过程,对NF的结构有着更严格的要求(Ardourel *et al.*, 1994)。

从结构上看,根瘤一般可分为定型根瘤和不定型根瘤(图1)。前者主要在热带豆科植物如大豆(*Glycine max*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)等的根上形成,这类根瘤只在发育早期出现细胞分裂,随后只进行细胞的伸长生长。在成熟的根瘤内,包含固氮细胞的中央组织是均一的。不定型根瘤则通常形成于温带豆科植物上,如**蒺藜苜蓿**、豌豆(*Pisum sativum*)、蚕豆(*Vicia faba*)及白花三叶草(*Trifolium repens*)等,它们具有明显的分层: I层为顶端分生组织; II层为含有根瘤菌的侵染区; 然后是富含淀粉粒的II-III中间带,主要的转录变化即发生于此; III层为固氮区,其中充满能固氮的类菌体; 最后是接近衰老的IV层(Vasse *et al.*, 1990; Brewin, 1991; Hirsch, 1992)。要注意的是,日本百脉根虽然和**蒺藜苜蓿**同属于温带豆科植物,但却形成定型根瘤。

实际上,定型根瘤与不定型根瘤的区别不仅表现在结构上,在发育早期,它们就已经显示了不同:不定型根瘤的根瘤原基形成于内皮层,而定型根瘤的根瘤原基形成于外皮层;不定型根瘤早期伴随有胞质桥的发生,而定型根瘤则不一定,如菜豆(*Phaseolus vulgaris*)就不像日本百脉根一样形成胞质桥(van Spronsen *et al.*, 2001)。另外,类菌体在不

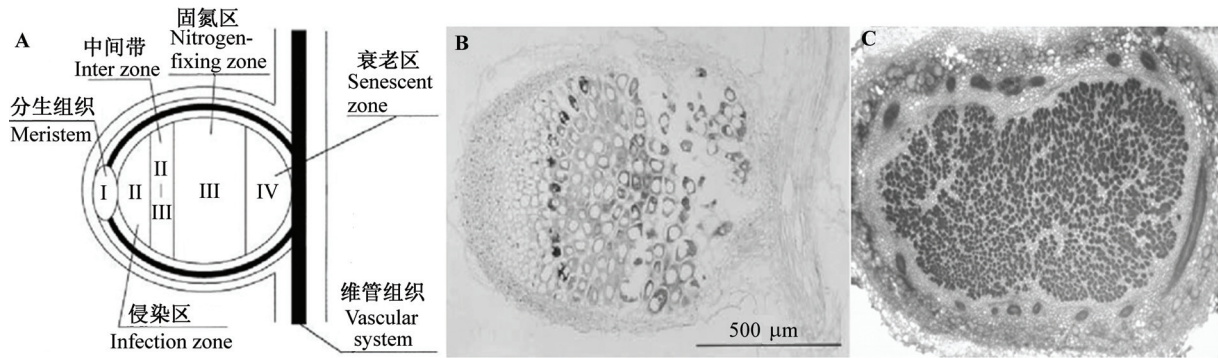


图1 定型根瘤与不定型根瘤示意图。A, 不定型根瘤结构模式图。B, 紫云英不定型根瘤纵切图。C, 大豆定型根瘤纵切图。A和B来自Naito等(2000), C由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮研究室提供。

Fig. 1 Diagram of the determinate- and indeterminate-type nodule. A, Schematic representation of the five distinct regions of an indeterminate type nodule. B, The vertical dissection of an indeterminate type nodule of *Astragalus sinicus*. C, The vertical dissection of a determinate type nodule of soybean. A and B are derived from Naito *et al.*, 2000; C is provided by the laboratory of Biological Nitrogen Fixation, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China.

同类型根瘤中的形成与代谢也各异。在定型根瘤中, 共生体间可以相互融合, 或者同一共生体中的类菌体进一步分裂, 结果形成几个类菌体共存于一个共生体中的局面; 而在不定型根瘤中, 单个的共生体连同类菌体一起分裂, 结果更多地是一个共生体中只包含一个类菌体(Prell & Poole, 2006)。研究表明, 在侵入线发育过程中, 聚羟基丁酸(PHB)在根瘤菌细胞中大量贮存(Lodwig *et al.*, 2003, 2005)。在定型根瘤的类菌体形成过程中, PHB颗粒裂解; 同时, 以不产PHB的根瘤菌突变体接种豌豆, 其不定型根瘤中的类菌体在发育过程中消耗了更多的植物淀粉(Lodwig *et al.*, 2005), 表明PHB在类菌体形成中作为碳源和能源被利用, 分解代谢的急剧增强导致了PHB的消耗。但在定型根瘤中, 即使是成熟的类菌体, 仍然继续积累着大量的PHB。类菌体固定形成的 NH_4^+ 进入植物细胞后, 在许多豆科植物特别是结不定型根瘤的植物细胞中, NH_4^+ 被结合形成谷氨酰胺或天冬酰胺, 而在热带结定型根瘤的豆科植物中, NH_4^+ 被结合为酰胺(Lodwig & Poole, 2003)。

然而, 无论哪种根瘤, 其形成和发育都离不开植物基因的调控和参与。van Kammen (1984)将在结瘤过程中被诱导表达或表达增强的植物基因定义为结瘤素基因, 表达产物称为结瘤素。根据表达时间的早晚, 结瘤素基因可以分为早期结瘤素基因和晚期结瘤素基因, 前者在开始固氮前表达, 主要参与根瘤的形成和发育; 后者则在发育完全的、成熟的根瘤中表达, 与根瘤的功能有关, 包括一些参

与初级代谢的酶、维持根瘤完整结构的蛋白质等, 其中研究得较为清楚的是豆血红蛋白基因(Nap & Bisseling, 1990)。

因为植株个体矮小、生育期短、基因组小、自花授粉和可被转化等优点, 蒺藜苜蓿和日本百脉根分别作为不定型根瘤和定型根瘤结瘤系统的代表植物而受到广泛研究。利用反向遗传学手段, 人们从这两种模式植物中获得了各种结瘤缺失突变植株, 从而开始了结瘤信号识别途径的研究。这些突变株一般分为两类: 不能结瘤的突变株 Nod^- 和不能固氮的突变株 Fix^- 。此外, 还有超结瘤突变株。

2 根瘤形成早期的信号传导

根瘤形成早期信号传导基因的分离主要通过突变株的研究获得, 该类突变株不能形成根瘤、在结瘤因子信号传导中存在缺陷。最重要的突变之一应是来自日本百脉根的 $nfr1$ 和 $nfr5$ 突变株(Radutoiu *et al.*, 2003), $NFR1$ 和 $NFR5$ 基因编码LysM类丝氨酸/苏氨酸受体激酶(LysM RLKs)。LysM是一个肽聚糖结合结构域, 最初在细菌溶素和溶菌酶中发现, 一般存在于和细菌细胞壁及病原相关的蛋白质中。由于结瘤因子的基本结构是N-乙酰葡萄糖胺以 β -1,4糖苷键相连的多聚体, 类似于肽聚糖的结构(N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺通过 β -1,4糖苷键相连的多聚体), 因此, 虽然缺乏生化上的证据, $NFR1$ 和 $NFR5$ 被公认为是直接与结瘤因子相作用的受体, 存在于质膜上。通过序列比较, 类似的突变株 nfp

(Nod factor perception)和*sym10* (symbiosis 10), 相继在蒺藜苜蓿(Amor *et al.*, 2003)和豌豆(Walker *et al.*, 2000)中发现, 其中的相关基因同样编码LysM RLKs。在LysM类受体激酶突变株中, 所有结瘤因子诱导的反应(包括钙流和钙峰这一结瘤因子信号传导途径中最早出现的反应)均被破坏。

在蒺藜苜蓿中, 还发现一组不能形成侵染(do not make infections)的突变株: *dmi1*、*dmi2*、*dmi3*, *dmi1*和*dmi2*突变株不能被结瘤因子诱导产生钙峰, 钙流的存在也较野生型短暂(Wais *et al.*, 2000; Shaw & Long, 2003; Ané *et al.*, 2004)。DMI1由氨基端序列介导定位于蒺藜苜蓿根及根瘤细胞的核膜上, 羧基端包含一个钾离子电导率调控蛋白结构域(RCK), 与产甲烷杆菌中的钾离子通道蛋白(MthK)有着高度的相似性, 包括RCK在内的羧基端缺失突变明显干扰了根瘤的形成, 并使得G蛋白拮抗物胡蜂毒素诱导的钙峰不能形成。研究者们认为, DMI1并没有直接参与结瘤因子诱导的钙离子变化, 而是调控着钙离子通道蛋白(Riely *et al.*, 2007; Peiter *et al.*, 2007)。DMI1在日本百脉根中有两个同源蛋白质: POLLUX和CASTOR, 它们的突变株虽能发生根毛分枝与变形, 但不发生根毛卷曲, 也不能形成侵入线; 与DMI1不同, POLLUX和CASTOR定位于质体上, Imaizumi-Anraku等(2005)推测它们可能形成复合物, 调节钙离子流穿过质体膜。近年的研究表明, POLLUX和CASTOR也为另一更古老的共生体系——植物与真菌的共生互作所需, 在豆科植物和非豆科植物中广泛存在且高度保守(Banba *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009)。DMI2编码一个含有重复的亮氨酸丰富结构域类受体激酶(LRR-RLK), 定位于质膜和侵入线膜上(Endre *et al.*, 2002; Limpens *et al.*, 2005), 它的同源物有: 来自日本百脉根和田菁(*Sesbania cannabina*)的SYMRK (symbiosis receptor kinase; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的NORK (nodulation receptor kinase; Endre *et al.*, 2002)和豌豆的SYMI9 (Stracke *et al.*, 2002)。*dmi3*编码钙离子/钙调素依赖的蛋白激酶(CCaMK) (Lévy *et al.*, 2004), 日本百脉根中与其同源的基因为SNF1 (spontaneous nodule formation 1)。CCaMK含有一个自抑制结构域, 在与钙调素结合后自抑制结构域释放, 使得CCaMK的激酶活性得以表达, 从而激活根瘤的形态发生过

程。和*dmi1*、*dmi2*一样, *dmi3*不能共生结瘤, 但该突变株能形成钙峰。在不接种根瘤菌的情况下, 自激活的CCaMK能诱导早期结瘤素基因*ENOD11*的表达, 并在植株上形成根瘤(Gleason *et al.*, 2006; Tirichine *et al.*, 2006)。除了负责转换钙峰信号以外, DMI3还可能通过磷酸化的方式控制NSP1的表达(Smit *et al.*, 2005)。

nsp1、*nsp2* (nodulation signaling pathway 2)具有和*dmi3*类似的突变表型, 遗传学分析表明, 它们位于*dmi3*的下游, 编码属于GRAS家族的蛋白质(Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005)。GRAS结构域包含两个亮氨酸丰富区和一些小的稳定的保守序列, 如VHIID、PFYRE和SAW, 这个家族的成员与植物赤霉素和光敏色素的信号传导有关, 推测是一些转录调控因子。NSP1、DMI3均定位于根表皮细胞和皮层细胞的细胞核上(Smit *et al.*, 2005), NSP2则定位在核膜和内质网上(Kaló *et al.*, 2005)。研究表明, 蒺藜苜蓿经结瘤因子处理后, 一些早期结瘤素基因迅速表达, 其中包括*ENOD11*。自激活的CCaMK也能诱导*ENOD11*的表达, 同时还需要NSP1、NSP2及*ERN1*等基因参与调控(Gleason *et al.*, 2006; Tirichine *et al.*, 2006; Middleton *et al.*, 2007), 表明CCaMK传递的钙信号正是通过上述NSP1、NSP2、ERN (ERF required for nodulation)等转录调控因子激活了靶基因的表达。ERN1及其同源蛋白ERN2、ERN3直接作用于*ENOD11*的启动子, 其中, ERN1和ERN2为转录激活物, 而ERN3则起抑制作用(Andriankaja *et al.*, 2007)。最近的研究证实, 在体外, NSP1可直接结合于*ENOD11*、*ERN1*、*NIN*等早期结瘤素基因的启动子部位, 表明这些基因的诱导需要NSP1; 而在体内, NSP1与*ENOD11*启动子的相互作用还需要NSP2, 亦即以NSP1-NSP2异源多聚体的形式与之结合(Hirsch *et al.*, 2009)。ERN类调控因子和NSP1与*ENOD11*启动子之间的结合位点仅相距26 bp, 推测这两类蛋白质之间可能存在着一定的相互作用。可见, 在NF信号传导途径中, 钙离子作为第二信使, 负责着宿主细胞质膜对根瘤菌NF的识别到细胞核中基因的表达变化之间的信号链接。

与ERN一样, EFD (ERF required for nodule differentiation)也属于乙烯响应因子群V (ethylene response factor group V, ERF V)的转录因子, 但是, EFD的氨基酸序列及表达方式均明显有别于ERN蛋

白质(Vernié *et al.*, 2008)。研究表明, EFD负调控着根瘤菌引起的侵染结瘤, 并为有固氮功能的根瘤形成所必需; 另外, EFD激活了细胞分裂素的初级受体基因*Mt RR4*的表达, 可能因而阻遏了细胞分裂素信号传递过程, 结果抑制了新的根瘤起始, 却促进了已起始根瘤分生组织细胞的分化(Vernié *et al.*, 2008)。因此, EFD很可能是连接根瘤形成早期和晚期阶段的一个关键调控因子。来自日本百脉根的调控因子*LjERF1*属于另一个不同的乙烯响应因子群IX (Asamizu *et al.*, 2008), *LjERF1*在根瘤菌*Mesorhizobium loti*对宿主的成功侵染过程中发挥着重要作用。接种后, *LjERF1*只在根的表皮细胞中表达, 在根瘤中没有任何表达, 推测是根瘤形成早期的正调控因子。

Kanamori 等(2006)报道了一个核孔蛋白NUP133, 它的基因突变导致了日本百脉根的温敏型结瘤缺失, 即使在适宜的温度下, 也只能形成无效瘤, 侵入线中的少量根瘤菌不能被释放; 而且, 它对钙峰的诱导是必需的; NUP133定位于核膜上。因此, 在宿主植物识别相应的根瘤菌后, NUP133可能在核-质信息交流中起着一定的作用。在对上述突变株的研究中还发现, *dmi*类和*nup133*突变株也不能与菌根真菌共生, 真菌不能在植株体内定殖, 表明在这个古老的共生体系中, *DMI*及*NUP*类基因在菌根真菌的早期信号传导中同样起着重要作用(Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Ané *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004; Lévy *et al.*, 2004; Kanamori *et al.*, 2006)。

其他重要的不结瘤突变株还有在根瘤发育或起始信号转换上存在缺陷的日本百脉根突变株*nin* (Schauser *et al.*, 1999)、来自蒺藜苜蓿的不能发生根毛卷曲的*hcl* (Wais *et al.*, 2000)等。这两种突变株虽然能够感知结瘤信号并表现根毛变形及显示钙峰, *nin* (nodule inception)甚至可以发生个别根毛的过度卷曲, 但它们不能形成侵入线、根瘤原基等。NIN含有跨膜结构域和一个DNA结合结构域, 推测是一个转录因子, 从豌豆中分离到它的同源基因*SYM35* (Schauser *et al.*, 1999; Borisov *et al.*, 2003)。对蒺藜苜蓿同源突变株*Mtnin*的研究显示, NF早期信号传递过程并不需要NIN, 但NIN调控着*ENOD11*的空间表达, 并因此可能控制着结瘤数量; 而且, *MtNIN*对于自激活CCaMK诱导的自发结瘤过程是必需的。尽管*hcl* (hair curling)突变株与*Mtnin*有着相似的表

型, 但*HCL*对于CCaMK诱导的根瘤形成却并非必不可少(Marsh *et al.*, 2007)。研究表明, *HCL*编码的LYK3受体蛋白与日本百脉根中的NFR1同源, 也含有LysM结构域, LYK3控制着根毛卷曲, 并以依赖于结瘤因子结构的方式控制着侵入线的形成, 可能是结瘤因子的进入受体(Limpens *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007)。

综上所述, 可以将目前已知的豆科植物早期共生结瘤过程中的信号流及生理反应表示为图2。

3 侵入线的形成及固氮的分子基础

这方面的研究主要通过*Fix⁻*突变株揭示, 该类突变株虽可结瘤或形成瘤状物, 但不能固氮。从蒺藜苜蓿中分离到了不少这种类型的突变株, 如形成小的、肿块状的无效根瘤的*lin*、*nip*、*Mtsym1*。*lin* (lumpy infections)只能形成根瘤原基, 侵染过程仅限于根表皮细胞, 皮层细胞中没有侵入线的形成, 接种后的根中检测不到乙炔还原活性(Kuppusamy *et al.*, 2004)。*nip* (numerous infections and polyphenolics)虽然有侵入线的形成, 但发育很不正常, 且

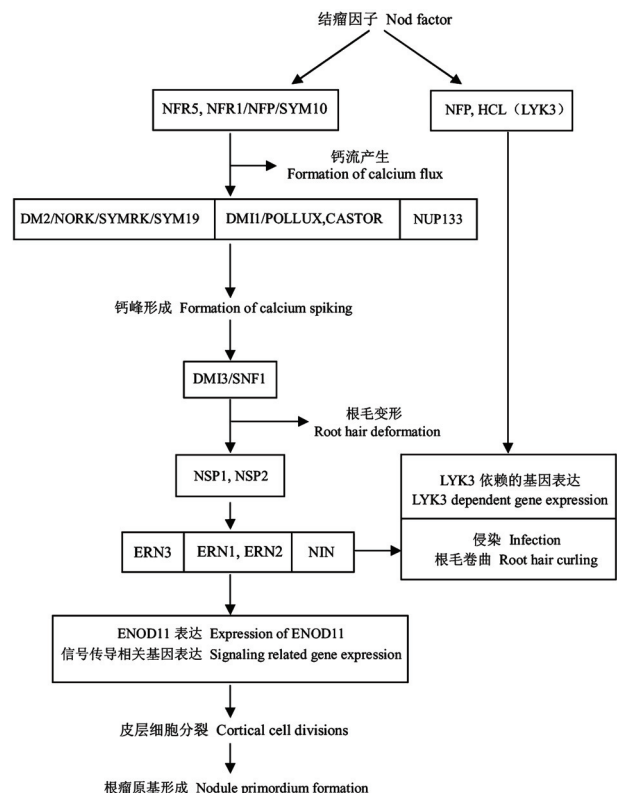


图2 共生结瘤早期结瘤因子的信号传导途径。
Fig. 2 The Nod factor signaling pathways during early symbiotic nodulation.

极少释放根瘤菌至宿主细胞或根瘤菌不能完成分化, 一些与植物防御有关的基因表达增强(Veereshlingam *et al.*, 2004)。在*Mtsym1* (Bénaben *et al.*, 1995)中, 晚期结瘤素基因如*LBI*、*CAMI*、*N3I*不能表达, 也没有乙炔还原活性。最近, Teillet等(2008)从蒺藜苜蓿中分离到一个*api* (altered nodule primordium invasion)突变株, 表现为根瘤菌的侵染过程刚好在进入根瘤原基之前失败, 结果在与根瘤原基相邻的外皮层中形成大的侵入袋(侵入线变形增大后形成的袋状结构), 在根上形成一些小的瘤状物。研究显示, API与乙烯代谢及结瘤因子信号传递没有关系; 遗传图谱及上位分析显示, API应在*ERN1*和*LIN*的下游及*NIP*的上游行使功能。

从蒺藜苜蓿中, Starker等(2006)还筛选到了8个*dnf* (defective in nitrogen fixation)突变株, 它们均结白色小瘤。其中, 除了*dnf3*、*dnf6*可显示少量乙炔还原活性外, 其余突变株均检测不到固氮酶活性; 包括*LBI*、*CAMI*、*N3I*在内的晚期结瘤素基因在大多数*dnf*突变株中都能正常表达, 只有*dnf1*、*dnf5*、*dnf2*例外: *dnf1*、*dnf5*不表达所有上述基因, *dnf2*则不表达*N3I*。这些突变株中根瘤菌基因*nodF* (与侵染起始及根瘤发育有关)、*exoY* (与侵染有关)、*bacA* (为根瘤菌在宿主细胞中的存活所需)和*nifH* (固氮基因)的表达结果显示, *dnf2*中只有少量根瘤支持表达*nodF*和*bacA*; *dnf1*、*dnf2*和*dnf5*不能启动*nifH*的表达, 其余突变株表达*nifH*的根瘤数量只有野生型的26% (*dnf4*)、32% (*dnf7*)或一半(*dnf3*、*dnf6*); *exoY*在*dnf3*、*dnf5*、*dnf6*中的表达显著下降。可见, 一个有功能的根瘤不仅已经完成了组织分化, 还需要为根瘤菌提供合适的环境, 激活相关基因的表达, 才能发挥其固氮功能。

另外, 来自日本百脉根的*crinkle* (*Ljsym79*)突变导致侵入线不能穿过表皮细胞, 少数根瘤含有形状不规则的能固氮的类菌体, 能够表达豆血红蛋白基因; 植物本身也出现了异常发育(Tansengco *et al.*, 2003)。在*alb1* (*Ljsym74*)突变株形成的无效瘤中, 根瘤中的维管束发育不全, 根瘤菌被包裹在异常增大了的侵入线中, 不能释放进入植物细胞(Imaizumi-Anraku *et al.*, 2000)。

4 豆科植物结瘤的自主调控分子机制

根瘤的形成虽然有利于植物在氮素营养不足

的环境中生存, 但这毕竟是一个耗能的过程, 根瘤数目过多将对植物的生长造成不利的影响, 为了解决这一矛盾, 豆科植物在长期进化中已经发展出一套负反馈调节机制: 已经形成的根瘤能够抑制新的根瘤的形成。豆科植物的这一自主调控机制 (autoregulation of nodulation, AON)主要通过根-茎-根之间的长距离信号交流实现: 受结瘤因子刺激后, 根部产生某种信号分子被运至茎部, 茎解读此信号后合成出新的信号分子再输送到根部, 从而对根瘤的数目进行控制。除此之外, 我们认为, AON调控体系还应该包括细胞-细胞间的短距离信号交流。另外, AON调控体系不仅控制着根瘤的数目, 同时也可能控制着根瘤的类型。

4.1 长距离交流体系中根产生的信号分子

日本百脉根超结瘤突变株*har1*与野生型植株之间的嫁接试验表明, 超结瘤表型由茎的基因型决定, 从而引出茎产生的某种物质对根瘤数量进行控制的推测。序列分析显示, *HAR1* (hypernodulation aberrant root formation 1)编码一个富含亮氨酸的类受体激酶, 和来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的*CLAVATA1* (*CLV1*)有着很高的同源性(Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002a)。CLV1是一个类受体激酶, 在拟南芥中, 通过与经由CLV3加工而来的小分子多肽相结合, 以细胞-细胞的短距离信号传递方式, 调控着茎和花顶端分生组织细胞的增殖(Ogawa *et al.*, 2008)。CLV3属于CLE家族 (CLAVATA3/ESR-related family)成员, 研究表明, CLE家族所编码的蛋白或加工后的小分子多肽常常作为胞外多肽激素发挥作用。此外, 大豆、豌豆和蒺藜苜蓿的同源基因产物NARK (nodule autoregulation receptor kinase; Searle *et al.*, 2003)、SYM29 (Krusell *et al.*, 2002)、SUNN (super numeric nodules; Schnabel, *et al.*, 2005)对根瘤数量的控制也都是通过茎-根之间的长距离信息交流实现的, 这些AON基因均与*CLV1*有着极高的序列相似性。因此, 有理由认为, AON信号调控系统也可能以CLE蛋白作为多肽激素, 激活了HAR1类受体激酶。

近年, 从日本百脉根中分离到2个CLE基因: *LjCLE-RS1*和*LjCLE-RS2*, 研究表明, 这两个基因都只在根中表达, 并在接种根瘤菌后的24 h内表达量迅速上升; 发根转化实验结果显示, 它们在野生型植株根中的过度表达强烈抑制了根瘤的形成, 而

且, 这种抑制效果还能传递至未转化的根; 同时, HAR1 这一类受体激酶对于 *LjCLE-RS1/RS2* 发挥抑制作用必不可少(Okamoto *et al.*, 2009)。此外, 在蒺藜苜蓿中也发现了两个与根瘤数目控制有关的基因: *RALFL1* (rapid alkalization factor-like 1) 和 *DVLI* (devil 1), 与 *LjCLE-RS1/RS2* 类似, 二者的超表达同样引起根瘤数目的急剧下降(Combier *et al.*, 2008a)。但是, 这两个基因是否也作为 AON 基因行使功能, 尚待进一步研究。已经证实, 乙烯能够以局部调控的方式控制根瘤数目, 这种抑制作用不同于 AON 的系统控制。蒺藜苜蓿的乙烯不敏感突变体 *sickle*, 也表现过度结瘤现象, 且具备完整的 AON 调控系统; 其中的相关基因 *MtSkil* 与拟南芥中的乙烯信号传导基因 *Ein2* 同源(Penmetse *et al.*, 2008)。因此, 也可能与 *MtSkil* 类似, *MtRALFL1* 和 *MtDVLI* 介导了结瘤因子与乙烯调控系统之间的某种分子对话。

4.2 长距离交流体系中茎对来自根的信号分子的响应

已有研究表明, *LjHAR1* 的启动子主要在叶、茎, 以及根瘤组织中的韧皮部表达(Combier *et al.*, 2008a)。而韧皮部被普遍认为是长距离信号传递通道(Lough & Lucas, 2006)。鉴于此, Magori 和 Kawaguchi (2009) 认为, 来自根部的小分子多肽如 *CLE-RS1/2* 被输送到茎部, 直接或间接地激活了 CLV1 类受体激酶, 而 CLV1 的主要作用可能是介导茎中合成相应的信号分子并与之结合, 随后通过韧皮部运至根部, 并与相应的受体结合。然而, 茎中合成的信号分子究竟是什么, 目前尚无确切的报道, 尽管有一些研究表明, 茉莉酸、生长素等植物激素可能在 AON 系统中发挥作用, 但实验结果往往相互矛盾。此外, 类黄酮也可能通过介导生长素的极性运输而影响根瘤的形成(Hirsch, 1992)。在蒺藜苜蓿和大豆中, 类黄酮合成途径中相关基因的表达沉默导致结瘤减少, 同时增强了生长素由茎到根的运输水平(Subramanian *et al.*, 2006; Wasson *et al.*, 2006)。但是, 在大豆中, 类黄酮合成酶基因的沉默导致的结瘤下降可以通过加入结瘤因子等方法解除(Subramanian *et al.*, 2006), 说明至少在大豆中, 类黄酮对结瘤过程的影响也许并不是通过对生长素运输的调控实现的。

虽然来自茎的因子尚未证实, 但其在根中的可

能受体或信号中间载体已经被报道: 嫁接试验表明, 与 *har1* 不同, 日本百脉根突变株 *tml* (too much love) 超结瘤表型是由根的基因型控制的, 而且 *har1* 突变不能使 *tml* 的根瘤数目明显增加; 此外, TML 对结瘤的抑制作用不能在根与根之间传递。因此, TML 可能是茎信号分子的根部受体, 在 *har1* 下游起作用(Magori *et al.*, 2009)。考虑到 AON 的系统调控方式, 显然, 在 TML 下游应该有可移动信号分子的产生, 以使茎对根瘤形成的抑制效应能在根与根之间传递。

除了 CLV1 类受体激酶, KLAVER(KLV) 是另一个自日本百脉根的茎中获得的 AON 信号体系成员。但是, *klavier* 突变株除了根瘤数目增多外, 还出现叶脉凸起、开花延迟、植株矮化等现象(Oka-Kira *et al.*, 2005)。日本百脉根的另一突变株 *astray*, 能形成二倍于野生型的根瘤, 且提早结瘤, 在非共生条件下, 此突变株对重力和光的反应存在缺陷(Nishimura *et al.*, 2002b)。ASTRAY 能够在植物的叶片、子叶、茎、胚轴、根及根瘤等组织中表达, 根部是否接种根瘤菌对其表达没有明显影响。ASTRAY 编码蛋白质 LjBzf, 其 C 端具有亮氨酸锌指结构域, 与拟南芥 HY5 蛋白高度同源, HY5 是一个与光形态发生有关的调控因子; LjBzf 的 N 端含有一个 RING-finger 和一个酸性区域。Nishimura 等(2002b) 认为, LjBzf 中包含的结构域组合为豆科植物所特有的, 负控制着根瘤的形成。这些现象说明, KLV 和 ASTRAY 可能是植物生长发育过程中一个多功能的普遍性调控因子, 不仅控制着根瘤的形成, 同时还调控着植物的其他生理过程。

4.3 细胞与细胞之间短距离交流对根瘤形成过程的控制

实际上, 除了茎与根之间长距离信号传递体系外, 根瘤起始和根瘤数目的调控应该还包括细胞与细胞之间的短距离分子对话, 后者可能主要以胞间连丝作为交流通道(plasmodesmata, PD)。通过荧光跟踪、绿色荧光蛋白(GFP)报告系统等方法, 研究人员分析了蒺藜苜蓿中 PD 介导的韧皮部与根瘤原基之间的信息交流情况(Imlau *et al.*, 1999; Complainville *et al.*, 2003)。研究发现, 接种根瘤菌后, 在刚刚开始分裂的皮层细胞中, 即可检测到 GFP 信号, 而根瘤原基正是由这些皮层细胞分裂形成的。在这些根瘤起始细胞中, GFP 在细胞分裂完成前即已表达,

这与PD网络重新排布相一致,说明PD介导了NF激活后的植物细胞与其他部分之间的分子交流,这对根瘤的形成可能非常重要(Complainville *et al.*, 2003)。AON体系中最终能在根与根之间进行某种抑制因子的传递,可能正是经由PD的短距离交流实现的。

4.4 茎对根瘤类型的控制

茎不但控制着结瘤数量,而且在决定根瘤的类型上也起着重要作用。通常情况下,蒺藜苜蓿与*Sinorhizobium meliloti*共生形成不定型根瘤,而日本百脉根与*Mesorhizobium loti*共生形成定型根瘤。两者之间的嫁接试验表明,嫁接了蒺藜苜蓿茎的日本百脉根的根能与*M. loti*共生形成定型根瘤,它的超结瘤突变株*har1-1*的根嫁接到蒺藜苜蓿茎上后可恢复野生型结瘤现象;然而,当蒺藜苜蓿的根与日本百脉根的茎嫁接后,无论接种*S. meliloti*还是*M. loti*,都不能结瘤,说明日本百脉根的茎不能支持蒺藜苜蓿的根与相应根瘤菌之间的结瘤,不定型根瘤的形成也许还需要某种来自茎的因子的参与(Lohar & VandenBosch, 2005)。茎对根瘤类型的控制可能也是AON体系的一部分。

5 环境中的氮素营养对根瘤形成的影响

豆科植物根瘤的形成不仅涉及共生双方的分子对话与调控,同时也与环境因素有关,如水分、矿质营养元素、温度、重金属、钠盐、CO₂、土壤类型以及pH等,其中,研究较为深入的是结合态氮素的影响。土壤中氮素养料的匮乏是根瘤形成、发育乃至发挥固氮功能必不可少的先决条件,高浓度的硝酸盐或铵盐的存在能够完全抑制根瘤的形成(Oka-kira *et al.*, 2005; Barbulova *et al.*, 2007),而低浓度的氮能促进植物生长并促进结瘤(Fei & Vessey, 2009)。实际上,来自不同豆科植物的超结瘤突变株都表现出了对硝酸盐的耐受性(Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002a; Searle *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2005)。在日本百脉根中,结合态氮的存在抑制了NF诱导的皮层细胞的分裂;相对于生长在无氮条件下的植株,在高浓度硝酸盐或铵盐环境中生长的野生型日本百脉根,在受NF诱导或接种*M. loti* 24 h后仍无*NIN*基因的表达;对于*har1-3*超结瘤突变株,即使在培养基中添加10或20 mmol·L⁻¹ KNO₃的情况下,*NIN*仍能被高水平诱导,但是,当加入10

mmol·L⁻¹ NH₄NO₃或琥珀酸铵时,*NIN*的表达与野生型一样被抑制。说明硝态氮和铵态氮可能在根瘤原基形成的不同时期发挥抑制作用,而*NIN*则在硝态氮的抑制信号途径中起关键作用(Barbulova *et al.*, 2007)。此外,硝酸盐增强了*LjCLE-RS2*在植物根中的表达,因此,*har1*超结瘤突变株之所以在有硝酸盐的环境中仍然结瘤,可能正是因为与硝酸盐信号途径相关的*LjCLE-RS2*失去了识别受体(Okamoto *et al.*, 2009)。

6 展望

6.1 信号传递相关基因的分离与根瘤形成的基因调控网络的完善

共生固氮分子机制涉及到宿主植物对细菌结瘤因子的特异性识别及宿主结瘤素基因的表达激活,其中包括与信号传导有关的基因,例如相关激酶和转录因子的表达。目前,对宿主植物对NF早期反应的分析、NF受体的克隆及部分信号传导基因的分离,已经在共生互作与植物信号传递之间打开了一道门。尽管已从不同的豆科植物中分离到不少结瘤素基因,但是,大部分基因在结瘤过程中的具体作用并不完全清楚。例如,大量的编码根瘤特异性的富含半胱氨酸簇的蛋白质(cysteine cluster protein, CCP)基因在不定型根瘤中被分离(Mergaert *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006),这些CCP具有抗微生物的保护蛋白的结构域,它们在根瘤中的转录明显增加,其生物学功能尚待研究。从上面的介绍中也可以看到,迄今分离到的与根瘤形成有关的转录因子,如NSP、ERN、NIN等,在根瘤形成中的具体功能需要进一步证实。而且,目前对类似的调控根瘤形成的结瘤素基因仍然知之甚少。无疑,包括植物激素在内的共生早期信号分子的分离及其功能研究,仍将继续是共生领域的研究热点;而随后的共生过程,如侵入线形成、根瘤菌的进入与释放等现象的探明也非常令人期待,这将为最终建立一个完整明确的根瘤形成的基因调控网络提供依据。

6.2 转录因子与小分子RNAs的作用

基因的转录动力学不仅与转录过程本身有关,而且与mRNA的稳定性相关,特别是在真核细胞中,mRNA的稳定性与细胞分化有着重要关系,并受到不编码的小分子RNAs (microRNAs, miRNAs)的调控。许多转录因子组成复杂的调控网络,负责器官

发生,根瘤的形成也不例外。在植物细胞中,miRNAs调节着转录因子的活性,编码转录因子的mRNAs正是miRNAs的作用目标(Brodersen *et al.*, 2008)。根瘤的形成中,也发现了类似的调控方式。来自蒺藜苜蓿的*MtHAP2.1*是目前分离到的少数在根瘤分生组织细胞中表达的基因之一,编码CCAAT结合蛋白家族的转录因子,其表达在根瘤的顶端分生组织中最为丰富,在与之毗邻的侵染带的细胞中表达降低,而在根瘤的其他组织中均检测不到。研究显示,*MtHAP2.1*的表达受到microRNA-169 (MIR169)的调控,MIR169的过度表达与利用*MtHAP2.1* RNAi的实验结果相似,都表现为根瘤的发育受阻;而MIR169介导的转录后调控功能的丧失则导致根瘤发育迟缓(Combier *et al.*, 2006, 2008b)。因此,MIR169可能通过限定*MtHAP2.1*的空间表达以及快速的转录后降解来促使根瘤细胞分化。在蒺藜苜蓿中,另一个小分子RNA——MIR166能够对HD-ZipIII (Class-III homeodomain-leucine zipper)家族的转录因子进行转录后调控,后者在根的维管组织中表达并与根瘤形成有关。MIR166的过度表达至少降低了3个HD-Zip III家族成员的转录,并因此影响了根维管组织的发育,阻碍了根瘤和侧根的形成起始(Boualem *et al.*, 2008)。可见,在根瘤器官发生的起始分化和根瘤细胞形成过程中,miRNAs调控着其间涉及的转录因子的时空表达方式。在不久的将来,可能会有更多的与根瘤形成有关的小分子RNAs被鉴定。因此,更多转录因子及其靶位启动子的证实和生物学活性的探明,miRNAs的分离及其功能研究,特别是豆科植物特异性的miRNAs的研究,应是未来豆科植物-根瘤菌共生互作领域的一个研究热点。

6.3 根瘤形成的进化研究

前文述及的参与根瘤形成的激酶、转录因子等调控基因同时也参与了侧根的形成,或者与植物和菌根真菌的共生互作有关,后者是一个植物王国中更为广泛、更为古老的共生体系;并且,已经分离到的大多数结瘤素基因,包括调控基因在内,都能在非豆科植物中找到同源序列,其中包括激酶、转录因子等参与调控的基因。Szczyglowski和Amyot (2003)认为,在进化过程中,豆科植物可能是通过利用植物业已存在的发育调控机制或其中的调控因子建立起与根瘤菌的共生关系的。因此,不难想

象,在豆科植物与根瘤菌的共生互作中,植物可能通过对根形态发生的调控方式的重新调整,而不是或不完全是通过产生新的蛋白质来促使根瘤形成。豆科植物之间、豆科植物与非豆科植物之间比较基因组学的研究将有助于解答这个问题。

6.4 AON信号途径的明确及其对环境因子的响应

根瘤的形成是共生体系内部的信息交流及其与环境因子相互作用的结果,这就需要一个能将内、外信号链接起来的系统调控方式。与NF信号体系相比,AON信号途径正是这样一个不仅能对共生体系内部信号(如NF)作出反应,同时还能对外界环境因子(如氮素浓度)作出回应的系统调控体系。某些环境因子(如氮素营养)对共生结瘤的影响也许就是通过AON实现的。然而,目前关于AON的研究才刚刚起步,其信号传递的具体途径仍不明确,这需要进一步分离AON相关基因并对其功能进行研究。同时,环境因子影响根瘤发育过程的分子机制问题,也是目前共生固氮研究领域里的一个薄弱环节。应用反向遗传学手段,将AON信号传递体系与环境因子,特别是不同结合态氮素对结瘤的影响相结合,将更有利于揭示这一豆科植物特有的自主调控方式。

致谢 陕西省自然科学基金(2009JM3011)和西北农林科技大学基本科研业务费专项资金(QN2009068)资助项目。华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮研究室给予支持,在此表示感谢。

参考文献

- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Mailliet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarie J, Gough C (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 34, 495–506.
- Andrianakaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt *ENOD11* activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *The Plant Cell*, 19, 2866–2885.
- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Lévy J, Debellé F, Baek JM, Kalo P, Rosenberg C, Roe BA, Long SR, Dénarié J, Cook DR (2004). *Medicago truncatula* *DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, 303, 1364–1367.
- Ardourel M, Demont N, Debellé F, Mailliet F, de Billy F, Prome JC, Denarie J, Truchet G (1994). *Rhizobium*

- meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors, different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *The Plant Cell*, 6, 1357–1374.
- Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, Tabata S, Sato S (2008). A positive regulatory role for *LjERF1* in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 147, 2030–2040.
- Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H (2008). Divergence of evolutionary ways among common *sym* genes, CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant & Cell Physiology*, 49, 1659–1671.
- Barbulova A, Rogato A, D’Apuzzo E, Omrane S, Chiurazzi M (2007). Differential effects of combined N sources on early steps of the Nod factor-dependent transduction pathway in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 994–1003.
- Bénaben V, Duc G, Lefebvre V, Huguet T (1995). TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 107, 53–62.
- Borisov AY, Madsen LH, Tsyganov VE, Umehara Y, Voroshilova VA, Batagov AO, Sandal N, Mortensen A, Schauser L, Ellis N, Tikhonovich IA, Stougaard J (2003). The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 131, 1009–1017.
- Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, Laffont C, Plet J, Combier JP, Niebel A, Crespi M, Frugier F (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54, 876–887.
- Brewin NJ (1991). Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 191–226.
- Brewin NJ (1998). Tissue and cell invasion by *Rhizobium*, the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ eds. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 417–429.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320, 1185–1190.
- Capoen W, Goormachtig S, de Rycke R, Schroevers K, Holsters M (2005). SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10369–10374.
- Cárdenas L, Holdaway-Clarke TL, Sanchez F, Quinto C, Feijo JA, Kunkel JG, Helper PK (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiology*, 123, 443–452.
- Chen C, Fan C, Gao M, Zhu H (2009). Antiquity and function of *CASTOR* and *POLLUX*, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiology*, 149, 306–317.
- Chou MX, Wei XY, Chen DS, Zhou JC (2006). 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. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2673–2685.
- Combier JP, Küster H, Journet EP, Hohnjec N, Gamas P, Niebel A (2008a). Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1118–1127.
- Combier JP, de Billy F, Gamas P, Niebel A, Rivas S (2008b). Trans-regulation of the expression of the transcription factor *MtHAP2-1* by a uORF controls root nodule development. *Genes & Development*, 22, 1549–1559.
- Combier JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M, Niebel A (2006). *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development*, 20, 3084–3088.
- Complainville A, Brocard L, Roberts I, Dax E, Sever N, Sauer N, Kondorosi A, Wolf S, Oparka K, Crespi M (2003). Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *Medicago* species. *The Plant Cell*, 15, 2778–2791.
- Dénarié J, Debellé F, Promé JC (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors, signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 503–535.
- Dénarié J, Roche P (1991). *Rhizobium* nodulation signals. In: Verma DPS ed. *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. CRC Press, London. 295–323.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417, 962–966.
- Fei H, Vessey JK (2009). Stimulation of nodulation in *Medicago truncatula* by low concentrations of ammonium: quantitative reverse transcription PCR analysis of selected genes. *Plant Physiology*, 135, 317–330.
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Muñoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, 441, 1149–1152.
- Graham PH, Vance CP (2003). Legumes, importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131, 872–877.

- Hirsch AM (1992). Developmental biology of legume nodulation. *The New Phytologist*, 122, 211–237.
- Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GE (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 21, 545–557.
- Imaizumi-Anraku H, Kouchi H, Syono K, Akao S, Kawaguchi M (2000). Analysis of *ENOD40* expression in *alb1*, a symbiotic mutant of *Lotus japonicus* that forms empty nodules with incompletely developed nodule vascular bundles. *Molecular and General Genetics*, 264, 402–410.
- Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, Kouchi H, Murakami Y, Mulder L, Vickers K, Pike J, Downie JA, Wang T, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Yoshikawa M, Murooka Y, Wu GJ, Kawaguchi M, Kawasaki S, Parniske M, Hayashi M (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, 433, 527–531.
- Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell*, 11, 309–322.
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, Kiss GB, Downie JA, Oldroyd GE (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, 308, 1786–1789.
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 359–364.
- Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczygłowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N, Stougaard J (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor like kinase. *Nature*, 420, 422–426.
- Kuppusamy KT, Endre G, Prabhu R, Penmetsa RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R, Vandenbosch KA (2004). *LIN*, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiology*, 136, 3682–3691.
- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F (2004). A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, 303, 1361–1364.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302, 630–633.
- Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T, Geurts R (2005). Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10375–10380.
- Lodwig E, Poole P (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 37–78.
- Lodwig EM, Hosie AH, Bourdes A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*, 422, 722–726.
- Lodwig EM, Leonard M, Marroqui S, Wheeler TR, Findlay K, Downie JA, Poole PS (2005). Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 67–74.
- Lohar DP, VandenBosch KA (2005). Grafting between model legumes demonstrates roles for roots and shoots in determining nodule type and host/rhizobia specificity. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1643–1650.
- Lough TJ, Lucas WJ (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 203–232.
- Magori S, Kawaguchi M (2009). Long-distance control of nodulation: molecules and models. *Molecules and Cells*, 27, 129–134.
- Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, Umehara Y, Kouchi H, Hase Y, Tanaka A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M (2009). *TOO MUCH LOVE*, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 259–268.
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GE (2007). *Medicago truncatula* *NIN* is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive CCaMK. *Plant Physiology*, 144, 324–335.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology*, 132, 161–173.
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kaló P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, VandenBosch K, Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GE (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *The Plant Cell*, 19, 1221–1234.
- Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE, Long SR (2004). A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule

- development, gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4701–4705.
- Naito Y, Fujie M, Usami S, Murooka Y, Yamada T (2000). The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*. *Plant Physiology*, 124, 1087–1096.
- Nap JP, Bisseling T (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis, the legume root nodule. *Science*, 250, 948–954.
- Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M (2002a). *HAR1* mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, 420, 426–429.
- Nishimura R, Ohmori M, Fujita H, Kawaguchi M (2002b). A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15206–15210.
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, 319, 294.
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S, Shikazono N, Tanaka A, Watanabe Y, Fukuhara I, Nagata T, Kawaguchi M (2005). *klavier* (*klv*), a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 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 Physiology*, 50, 67–77.
- Oldroyd GE, Mitra RM, Wais RJ, Long SR (2001). Evidence for structurally specific negative feedback in the Nod factor signal transduction pathway. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 28, 191–199.
- Peiter E, Sun J, Heckmann AB, Venkateshwaran M, Riely BK, Otegui MS, Edwards A, Freshour G, Hahn MG, Cook DR, Sanders D, Oldroyd GE, Downie JA, Ané JM (2007). The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiology*, 145, 192–203.
- Penmetsa RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Skisiel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR (2008). The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, *sickle*, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 55, 580–595.
- Prell J, Poole P (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14, 161–168.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425, 585–592.
- Riely BK, Loughnon G, Ané JM, Cook DR (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 49, 208–216.
- Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402, 191–195.
- 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 Molecular Biology*, 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.
- Shaw SL, Long SR (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology*, 131, 976–984.
- Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T (2007). *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiology*, 145, 183–191.
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308, 1789–1791.
- Starker CG, Parra-Colmenares AL, Smith L, Mitra RM, Long SR (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Physiology*, 140, 671–680.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 27, 959–962.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 48, 261–273.
- Szczyglowski K, Amyot L (2003). Symbiosis, inventiveness by recruitment? *Plant Physiology*, 131, 935–940.
- Tansengco ML, Hayashi M, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y (2003). *crinkle*, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 131, 1054–1063.

- Teillet A, Garcia J, de Billy F, Gherardi M, Huguet T, Barker DG, de Carvalho-Niebel F, Journet EP (2008). *api*, a novel *Medicago truncatula* symbiotic mutant impaired in nodule primordium invasion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 535–546.
- Timmers ACJ, Auriac MC, Truchet G (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126, 3617–3628.
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J (2006). Dereglulation of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, 441, 1153–1156.
- van Brussel AA, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJ, Kijne JW (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic Lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, 257, 70–72.
- van Kammen A (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2, 43–45.
- van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel A, Kijne JW (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *European Journal of Cell Biology*, 64, 88–94.
- van Spronsen PC, Gronlund M, Pacios Bras C, Spaink HP, Kijne JW (2001). Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 839–847.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, 172, 4295–4306.
- Veereshlingam H, Haynes JG, Penmetsa RV, Cook DR, Sherrier DJ, Dickstein R (2004). *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. *Plant Physiology*, 136, 3692–3702.
- Vernié T, Moreau S, de Billy F, Plet J, Combier JP, Rogers C, Oldroyd G, Frugier F, Niebel A, Gamas P (2008). EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 20, 2696–2713.
- Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmetsa RV, Cook D, Gough C, Denarie J, Long SR (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13407–13412.
- Wais RJ, Keating DH, Long SR (2002). Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium-legume* symbiosis. *Plant Physiology*, 129, 211–224.
- Walker SA, Viprey V, Downie JA (2000). Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13413–13418.
- Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell*, 18, 1617–1629.

责任编辑: 高玉葆 责任编辑: 王 葳