

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405009

李小平, 曾庆发, 张根生, 等. 大豆 microRNA 基因 *GmMIR160A* 负调控植物叶片衰老进程[J]. 广西植物, 2015, 35(1):84-91Li XP, Zeng QF, Zhang GS, et al. *GmMIR160A*, a class of soybean microRNA gene, negatively regulates progress of leaf senescence[J]. *Guihaia*, 2015, 35(1):84-91

大豆 microRNA 基因 *GmMIR160A* 负调控植物叶片衰老进程

李小平*, 曾庆发, 张根生, 赵娟

(淮北师范大学 生命科学学院 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

摘要: 叶片衰老是受内外多种因子影响的遗传发育进程。生长素、细胞分裂素和乙烯等多种植物激素是调控叶片衰老的重要内部因子, 它们通过长或短距离运输形成叶片组织内特定的区域分布和浓度梯度, 从而直接或间接参与植物叶片衰老过程。分子遗传学表明, 细胞分裂素和乙烯分别是叶片衰老的抑制子和正调节子, 而生长素如何参与叶片衰老的分子机制目前还不清晰。植物体内成熟小分子 RNA 由小 RNA 基因转录并通过特定酶加工形成的 21~23 bp 的双链 RNA 分子。这些小分子通过不完全配对方式抑制其靶基因转录和/或表达, 参与植物生长发育多个过程, 然而这类小 RNA 分子如何调控植物叶片衰老发育过程目前则还鲜有报告。大豆是重要的油料作物, 具有典型的单次结实性衰老特征。研究大豆叶片衰老具有重要的科学意义和深远的应用价值。该文采用实时荧光定量 PCR(qPCR) 技术分析大豆 (*Glycine max*) micro RNA 基因 *GmMIR160A* 的表达模式, 发现大豆第一复叶中 *GmMIR160A* 表达受外源生长素和黑暗处理的诱导, 暗示该基因是生长素快速响应的叶片衰老相关基因。为进一步探究 *GmMIR160A* 在大豆叶片发育中的功能, 构建了肾上腺皮质激素 (Glucocorticoid, GR) 类似物地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 诱导表达 *GmMIR160A* 二元表达载体并通过农杆菌介导的子叶节方法转化野生型大豆。通过抗性筛选和基因组 PCR 鉴定并结合表型分析, 共获得了 4 株诱导表达的稳定遗传转基因植株 (株系 OX-3、OX-5、OX-7 和 OX-8)。 *GmMIR160A* 过表达植株根、茎、叶、花和果实在形态学上与野生型相比无显著差异, 但叶片的叶绿素含量增加、最大光量子效率 (Fv/Fm) 增强。进一步分子分析发现, 转基因大豆叶片中 *GmARFs* 和衰老标记基因 (*GmCYSP1*) 表达明显下降, 表明大豆 *Gma-miR160* 通过抑制靶基因 *GmARFs* 的表达来负调控植物叶片的衰老进程。该文揭示了生长素通过小分子 RNA 调控叶片发育一条新途径, 为研究植物激素调控植物叶片衰老提供了新的思路。

关键词: 大豆; MicroRNAs; 生长素响应因子; 过表达

中图分类号: Q945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)01-0084-08

GmMIR160A, a class of soybean microRNA gene, negatively regulates progress of leaf senescence

LI Xiao-Ping*, ZENG Qing-Fa, ZHANG Gen-Sheng, ZHAO Juan

(College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Anhui Province Key Laboratory
of Resources in Plant Biology, Huaibei 235000, China)

Abstract: Leaf senescence is known to be a genetic programmed process regulated by the interior and/or exterior factors. Plant hormones including cytokinins, ethylene and auxin directly or indirectly regulate leaf senescence as pivotal

收稿日期: 2014-07-02 修回日期: 2014-11-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30970245); 安徽省教育厅基金 (kj2007B110); 安徽省优秀青年教师基金 (2007jq1161)。

作者简介: 李小平 (1972-), 男, 江苏南京人, 博士, 副教授, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) 1244232074@qq.com。

* 通讯作者

interior factors through their redistribution and local concentration gradient by long and/or short distance transport. The molecular genetics study has shown that the cytokinins work as a repressor and the ethylene as a positive regulator respectively during the processes of leaf senescence. However, the molecular mechanism of auxin involved in regulating leaf senescence is largely unknown. The mature microRNAs are a kind of small and short double-strand RNA molecules with 21–23 bp length, which are first transcribed from microRNA (miRNA) genes and then processed by the special enzymes. These small RNAs are proved to be involved in many plant growth and development processes by matching their specific targets in an inaccuracy manner. However, there is no evidence that the specific microRNA could regulate plant leaf senescence in soybean so far. Soybean is a both oil crop and the classical seed-setting dependent aging species. To uncover the molecular mechanism of soybean leaf senescence should have both the important scientific significance and the profound application value in the future. In this report, we used real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) approach to explore the expression pattern of *GmMIR160A* gene during the development of the first trifoliage soybean leaves. We found that the messenger RNA of *GmMIR160A* was rapidly induced by both exogenous applied auxin and darkness treatment, suggesting that this gene could be both an immediate auxin-responsive gene and leaf senescence-associated gene. To further investigate the role of *GmMIR160A* gene during the soybean leaf development, the binary vector over-expressing *GmMIR160A* induced by glucocorticoid-like chemical, dexamethasone (DEX), was constructed and then transformed into wild-type soybean through *Agrobacterium*-mediated method with cotyledon node as the explants. Using the time order screening approaches including the antibiotic screen, the genome PCR identification and the phenotypic analysis, we finally generated four transgenic lines (Line OX-3, 5, 7 and 8) with stable integrated insertion T-DNA. Compared with wild types control, these transgenic plants, successful expressing the transgene showed normal morphological characteristics in respect to roots, stem, leaves, flowers, fruits and seeds but exhibited the increased chlorophyll content and higher maximum quantum efficiency (Fv/Fm) for the first trifoliage leaves during the mature stage. Moreover, *GmARFs* and *GmCYSP1*, in which the former are targets of *GmMIR160* and the latter is thought as a soybean senescence marker, were down-regulated dramatically in the transgenic trifoliage leaves. Taking together, these data indicated that *Gma-miR160* might negatively regulate leaf senescence by repression of its targets in soybean. This report uncovered a novel pathway that the plant hormone auxin could modify the processes of leaf senescence by regulating the transcriptional expression of microRNA gene *Gma-miR160* and then repressing the messenger RNA level of auxin responsive factors *GmARFs* and also provided the new clues for investigating how the plant hormones control the progress of leaf senescence.

Key words: *Glycine max*; MicroRNAs; auxin response factors; over-expression

叶片衰老是遗传程序控制的主动发育进程。叶片衰老进程中,有些基因转录水平显著下降,称为衰老下调基因(senescence down-regulated genes, SDGS),如编码与光合作用有关的多数蛋白质基因;另一些基因是被衰老诱导表达的基因,称衰老相关基因(senescence-associated genes, SAGS),这类基因参与了新蛋白质的合成。多种植物激素直接影响或参与调控叶片衰老进程(Gan *et al.*, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Van der Graaff *et al.*, 2006)。乙烯通过其细胞信号组分如 EIN3 来正调控叶片衰老(Li *et al.*, 2013);细胞分裂素通过受体 AHK3/AHK4 和相应的下游磷酸化途径抑制植物叶片的衰老(Kim *et al.*, 2006)。另外,细胞分裂素还与类受体蛋白激酶形成调控网络参与调节叶片衰老过程(Li *et al.*, 2006)。生长素如何参与调控植

物叶片衰老过程中的作用机制目前不很清晰,尤其是作为正调节子的证据还不够。虽然发现生长素响应因子 AtARF2 功能缺失影响叶片衰老进程(Ellis *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2010),但生长素如何通过其细胞信号组分参与到叶片衰老的调控还有待进一步阐明。

在植物组织中,生长素通过长、短距离运输形成组织器官组织中的特定浓度梯度,从而调控在植物生长发育(Leyser, 2006; Dharmasiri *et al.*, 2004)。生长素受体(TIR1)、转录因子(Aux/IAA)、生长素响应因子(ARFs)和具有生长素响应元件(AuxREs, TGTCNC)的下游靶基因等组成生长素细胞信号转导的核心组分(Tiwari *et al.*, 2001; Kepinski *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004)。当生长素含量很低时, Aux/IAA 与 ARFs 结合,阻遏了下

游靶基因的转录;当生长素的含量达到一定程度,生长素就会起到分子胶的作用,使 Aux/IAA 与 TIR1 结合在一起,形成 SCF^{TIR1}-生长素-Aux/IAA 复合体,促使 Aux/IAA 降解,从而解除 Aux/IAA 对 ARFs 的抑制,释放下来的 ARFs 与下游具有 AuxRE 的靶基因结合,发挥生长素的调控功能(Tan *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2001)。ARFs 除受 Aux/IAA 调节外,其转录产物还受到转录后水平的 MicroRNAs 的调控。MicroRNAs 依靠序列不完全配对方式寻找靶基因并进而抑制它们的活性(Voinnet, 2009; Sunkar *et al.*, 2007; Nodine *et al.*, 2010)。拟南芥基因组含有 3 个小 RNA 基因(*AtMIR160A-C*),它们编码的成熟小 RNA (*Ath-miR160*) 和靶基因 *AtARF10*, *AtARF16* 和 *AtARF17* 在特定的器官组织中发挥重要的调节功能。修饰靶基因 *AtARF10*, *AtARF16* 和 *AtARF17* 的作用位点会导致靶基因转录本降解受阻及 *AtMIR160s* 的表达下调,并造成明显的发育障碍(Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005; Mallory *et al.*, 2005),暗示在植物组织中 *Ath-miR160* 和靶基因之间互为精确调控并维持一定平衡。在拟南芥中过表达 *AtARF10/16/17* 无明显的表型,推测是拟南芥细胞中表达有足够的 *Ath-miR160* 来维持对靶基因的抑制(Liu *et al.*, 2007),而对其它物种是否也存在这种现象还不是很清楚。本文以大豆叶片为研究材料,探究 *Gma-miR160* 及其靶基因是否在叶片衰老中发挥调控功能。在分析 *GmMIR160A* 在叶片衰老及生长素诱导中的表达特征基础上,我们通过农杆菌介导转化方法获得 *GmMIR160A* 过表达转基因大豆并对转基因植株叶片衰老表型进行分析。研究叶片衰老的分子机制对进一步的分子遗传育种具有理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种、质粒及培养基 菌种 *E. coli* DH5a;农杆菌 LB4404;植物表达载体 pTAM1,由本实验室提供。大肠杆菌培养:LB 培养基;农杆菌培养:YEP 培养基。

1.1.2 试剂与酶 常规 PCR 试剂和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;DNA 标准分子量购自全式金公司;高保真 KOD 酶购自上海东洋坊公司;RNA 提

取试剂盒为 System biosciences 和 Qiagen 公司,Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。高纯质粒小量提取试剂盒,购自威格拉斯生物技术公司,其它试剂均为上海生工产品。

1.1.3 引物 根据 <http://diana.imis.athena-innovation.gr/>和 <http://soybase.org/>提供 *GmMIR160A* 和靶基因(*GmARFs*)序列并结合 NCBI 数据库相应 EST,设计各定量 PCR 和相应载体构建引物(表 1)。*GmMIR160A-OX F/R* 是用于构建化学诱导过表达载体。

1.2 方法

1.2.1 大豆栽培和叶片处理 所试大豆种植在混合土壤中(泥炭土:珍珠岩:蛭石=3:3:1)中,于人工培养室中培养(16 h 白天/8 h 夜晚;光照 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;温度:23~25℃;相对湿度:70%)。叶片自然衰老:取营养生长期(V1)至生殖生长期(R5)最先出现的完全展开第一复叶(Fehr *et al.*, 1971),进行定量 PCR;离体叶片衰老处理:选取完全展开的第一复叶(20 d),放入加有蒸馏水的培养皿中,确保复叶叶柄与水充分接触,然后用锡箔纸包裹培养皿,放在恒温培养箱中进行黑暗处理,在不同时间间隔取出叶片(0, 3, 6 和 9 d),提取总 RNA 并分析。转基因植株基因表达(T3 代):选取完全展开的第一复叶(20 d),提取总 RNA 并进行定量 PCR。外源生长素处理:一定浓度的生长素 IBA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)喷在完全展开的第一复叶上(20 d),每隔 5 min 取下叶片,提取总 RNA 并分析。所有试验进行至少 3 次生物学重复。

1.2.2 *GmMIR160A* 定量 PCR RNA 提取和反转录按 System biosciences 的 QuantiMir RT Kit 操作手册进行,首先对小 RNA 3' 端添加腺苷酸形成多聚腺苷酸末端(PolyA),然后添加寡聚脱氧胸腺嘧啶接头,最后反转录形成 cDNA。反转录产物利用通用引物和小 RNA 特异引物的进行定量 PCR,荧光定量 PCR 试剂盒为 Takara SYBR[®] Premix Ex TaqTMII (DRR081A),相应引物见表 1。*GmMIR156b* 为内参基因(Kulcheski *et al.*, 2010)。按以下反应体系进行:2x Premix Ex TaqTMII(DNA polymerase, SYBR Green I, PCR buffer, $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, dNTP mix including dUTP)15 μL ;上游引物 F 1 μL ,下游引物 R 1 μL ;cDNA template 2 μL 。总体为 30 μL 。定量 PCR 仪扩增反应条件设置:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s~60℃

表 1 本文所用引物
Table 1 Primers used in this paper

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	应用 Application
qGmMIR160A	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	MircoRNA, RT
Oligo(dT)-adapter primer	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	Mirco RNA, RT
qGmARF10-F1	AGATGCTAATATGAACTGAAAATTCC	qRT-PCR, 163bp
qGmARF10-R1	AAGAATAGCAAACCTCGCTCGTG	qRT-PCR, 163bp
qGmARF16-F	GGAAAAAGGTGGAGGATAAAGAG	qRT-PCR, 121bp
qGmARF16-R	GAATGACTCTCCCTTTGTTTCAAC	qRT-PCR, 121bp
qGmARF17-F	CCGTCAAGTACTTCTAGCCTTGT	qRT-PCR, 109bp
qGmARF17-R	TCCTTTGCAACATCCCTCCCTC	qRT-PCR, 109bp
GmMIR160A-OX-F	CACACTAGTCTTTCAAACCCATTTGATTATGACT	Vector construction
GmMIR160A-OX-R	TGACTCGAGTCTAATTTACGGTAACTTGGGGTT	Vector construction
GmMIR160A-IF	AGAGAGAGAGAGAGATGGGGCA	Transgenic identify
GmMIR160A-IR	CTTATATGCTCAACACATGAGCG	Transgenic identify
qGmCYSP1-F	TCTCTAAAGATGAACTTTGAATGCT	qRT-PCR
qGmCYSP1-R	TCACTCAAACCAACTGAAATATTTA	qRT-PCR
qMIR156b	TGACAGAAGAGAGAGAGACACA	Internal control
qACT2/7-F	CTTCCCTCAGCA CCTTCAA	Internal control
qACT2/7-R	GGTCCAGCTTTCA CACTCCAT	Internal control

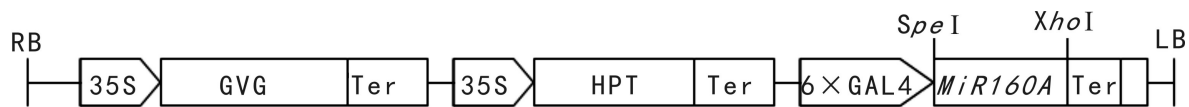


图 1 化学诱导基因表达载体 T-DNA 结构 编码转录因子 GVG 的 DNA 片段插入至 35S 启动子和终止子之间。GmMIR160A 片段通过内切酶 *SpeI* 和 *XhoI* 插入到 6×GAL4 启动子和终止子之间。HPT, 潮霉素; LB, 左边界; RB, 右边界。

Fig. 1 Diagram of T-DNA containing chemical-induced expression cassette DNA fragments encoding the chimeric transcription factor GVG were placed between the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the terminal sequence. GmMIR160A fragment was introduced into pTM-1 with two restriction enzymes *SpeI* and *XhoI* and was preceded by a promoter containing six copies of the GAL4. HPT, Hygromycin antibiotic; LB, Left border; RB, Right border.

60 s~72 °C 30 s(40 个循环);72 °C 10 min。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.2.3 *GmARFs* 和 *GmCYSP1* 定量 PCR 取对应叶片,按 Qiagen 公司专门提取 RNA 的试剂盒进行(RNeasy plant mini kit),反转录产物的荧光定量 PCR 试剂盒为 Takara SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (DRR081A)。ACT2/7 为定量的内标基因,扩增片段长度为 119 bp。GmCYSP1 是大豆叶片衰老标记基因,扩增片段长度为 162 bp。GmMIR160 调控 12 个靶基因(*GmARFs*)的转录,选择三个 *GmARFs* (*GmARF10/Gm13g* 40030. 1, *GmARF16/Gm10g*06080. 2, *GmARF17/Gm04g*43350. 1) 来分析 *GmMIR160* 过表达是否引起靶基因的抑制表达。*GmARFs* 和 *GmCYSP1* 表达量相对于大豆内标基因 ACT2/7,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.2.4 化学诱导型载体构建 利用高保真的 KOD

酶,以大豆基因组为模板,扩增 1 162 bp 的 PCR 片段,*GmMIR160A* 的前体序列位于该扩增片的中心位置(Laufs *et al.*,2004)。在 PCR 产物两端引入 *SpeI* 和 *XhoI* 位点,双酶切 PCR 产物后导入到 pTAM1 载体对应的克隆位点(图 1)。

1.2.5 农杆菌转化 取鉴定成功的双元载体 1~2 μL 用电击转化法转化农杆菌感受态细胞 LB 4404 (Bio-Rad,2.5 kv/um/ms)。转化后的农杆菌重悬于 1 mL YEP 培养基中,28 °C,转速为 $200 \times \text{g} \cdot \text{min}^{-1}$,培养 2~3 h,取 50~100 μL 涂在具有卡那霉素和壮观霉素(Spec^R)双抗 YEP 培养基上,28 °C 倒置培养 2~3 d。挑选已分散开的单克隆,经菌裂解 PCR 鉴定稳定表达的阳性克隆,用于大豆转化。

1.2.6 大豆转化和转基因鉴定 以科丰 34 品种大豆为材料,采用子叶节法进行转化,转化过程按文献并加以调整(Schmutz *et al.*,2010;Paz *et al.*,2004;

Paz *et al.*, 2006)。各转化培养基的成分:(1)萌发培养基(Gamborg B5 base salt, Sucrose 30 mg · L⁻¹, pH 5.8, Agar 6.5 g · L⁻¹);(2)共培养培养基:(1/10 Gamborg B5 base salt, Gamborg B 5 Vitamin, MES 3.9 g · L⁻¹, Sucrose 30 g · L⁻¹, BAP 1.8 mg · L⁻¹, GA3 0.2 mg · L⁻¹, AS 0.1 g · L⁻¹, DTT 200 mg · L⁻¹, Cysteine 400 mg · L⁻¹ pH 5.2, Agar 4.5 g · L⁻¹);(3)芽诱导培养基(Gamborg B5 base salt, Gamborg B5 Vitamin, MES 1.2 g · L⁻¹, Sucrose 30 g · L⁻¹, BAP 1.8 mg · L⁻¹, Cef 200 mg · L⁻¹, Carb 500 mg · L⁻¹, Hyg 25~50 mg · L⁻¹ pH 5.4, Phytigel 3.0 g · L⁻¹);(4)生根培养基(Gamborg B5 base salt, Gamborg B5 Vitamin, MES 1.2 g · L⁻¹, Sucrose 30 g · L⁻¹, IAA 1 mg · L⁻¹, pH 5.8, Agar 6.5 g · L⁻¹)。大豆筛选抗生素为潮霉素,筛选过程辅助以头孢霉素来去除残留农杆菌。抗性筛选成功的转基因小苗(T₀)经驯化后移入土壤中进行传代。用引物组合(GmMIR160A-IF/IR)对每代植株进行 PCR 鉴定, GmMIR160A-IF 是 *GmMIR160A* 上的特定序列, MIR160A-IR 是双元表达载体 pTAM1 上的转录终止区序列的特定序列, 扩增片段 851 bp。

1.2.7 叶片生理指标测定 大豆叶绿素提取用二甲基甲酰胺黑暗浸提 48 h 后, 用分光光度计分别测定 664 nm 和 647 nm 吸光值, 以叶片鲜重每克含有的叶绿素含量(单位: mg)来计量(Xiao *et al.*, 2004)。最大光量子效率 PSII(F_v/F_m)用脉冲调制荧光仪进行测定(FMS-2, Hansatech, King's Lynn, UK)(Wingler *et al.*, 2004)。

2 结果与分析

2.1 *GmMIR160A* 是受叶片衰老诱导的生长素快速响应基因

叶片衰老过程中, 大量基因进行表达, 这些基因的编码产物主要参与细胞内大分子的分解代谢和相关物质的运输, 而部分衰老相关基因则通过细胞信号途径来调控衰老过程。衰老相关基因的表达随叶片衰老呈现一定模式。为研究 *GmMIR160A* 在叶片衰老过程的表达特征, 分析了 *GmMIR160A* 在自然衰老和人工黑暗诱导衰老下转录水平的变化。结果显示, *GmMIR160A* 无论在自然发育和人工诱导衰老中其表达都随衰老进程而逐渐增加(图 2, 图

3), 说明 *GmMIR160A* 表达受衰老诱导, 是衰老相关基因。在外源生长素处理下, 一些基因表达会在很短时间(10~30 min)内就达到稳态水平, 这些基因为生长素原初响应基因, 它们的这种上调表达不依赖于蛋白质的重新合成。我们用生长素 IBA 处理叶片, 在不同时间间隔取样分析, 发现 *GmMIR160A* 的转录在 20 min 内就显著提高并保持一定的水平(图 4), 说明 *GmMIR160A* 的表达受生长素的快速诱导且是生长素的原初响应基因。

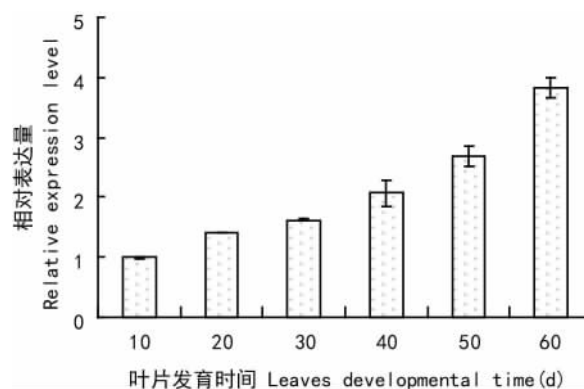


图 2 *GmMIR160A* 在叶片自然衰老进程中表达上调
Fig. 2 Expression level of *GmMIR160A* is up-regulated during natural leaf senescence

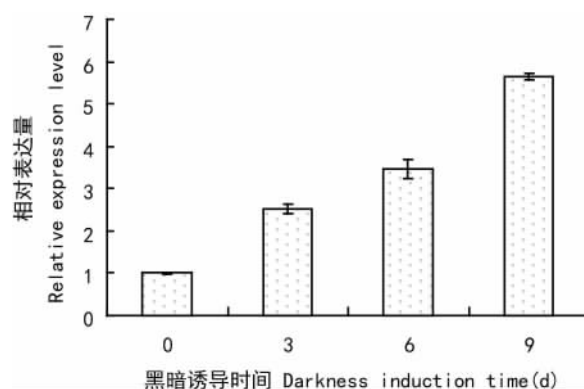


图 3 人工黑暗处理诱导 *GmMIR160A* 的表达
Fig. 3 Expression of *GmMIR160A* is induced during the dark-induced leaf senescence

2.2 化学诱导 *GmMIR160A* 过表达

为了探索 *GmMIR160A* 在叶片衰老进程中的功能, 我们构建了可用肾上腺皮质激素(Glucocorticoid, GR)类似物地塞米松(Dexamethasone, DEX)诱导的过表达载体(图 1)。通过农杆菌介导子叶节转化方法, 我们共获得 4 个稳定遗传的转基因株系(3, 5, 7 和 8)(图 5), 并对其中 3 个株系进行进一步

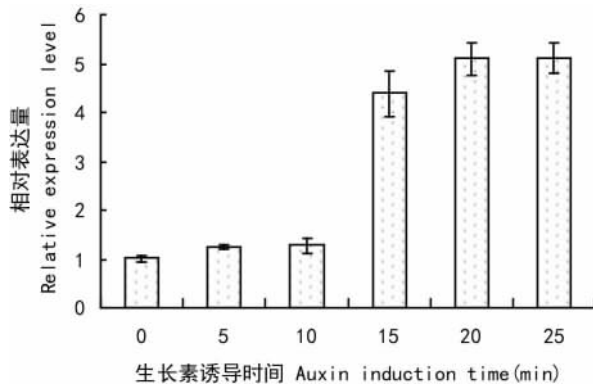


图 4 外源生长素快速调节 *GmMIR160A* 的表达

Fig. 4 Exogenous applied auxin increased expression of *GmMIR160A* quickly

分析。对自然生长叶片,我们用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DEX 每隔一天喷洒一次(Hou *et al.*, 2013);对离体叶片,直接在蒸馏水中加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DEX, 对照组用相应浓度的乙醇溶剂处理。试验表明, DEX 处理 8 d 后, *GmMIR160A* 表达增加 10 倍以上(图 6), *GmMIR160A* 对应的三个靶基因表达受到明显的抑制(图 7), 表明 *GmMIR160A* 在大豆叶片中被成功地过表达。

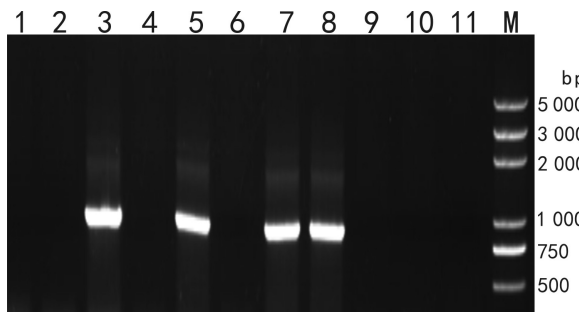


图 5 *GmMIR160A* 过表达转基因植株的 PCR 鉴定泳道 1-11. 不同 T₁ 代转基因株系; M. 标准分子量。

Fig. 5 PCR identification of transgenic plants over-expressing *GmMIR160A* Lane 1-11. Different T₁ transgenic lines; M. Molecular marker.

2.4 过表达 *GmMIR160A* 延缓叶片衰老

叶片衰老主要表现为叶绿体的崩溃,叶绿素的降解和相关大分子动员从而导致叶片发黄,最后叶片脱落死亡。叶片衰老导致叶绿体功能的丧失必然伴随着 PSII 和 PSI 活性的下降,但 PSII 比 PSI 对衰老更敏感,其光化学活性在衰老过程中下降十分明显(Wingler *et al.*, 2005)。大豆为单次结实衰老植物,即一旦结实迅速启动叶片衰老进程。营养生

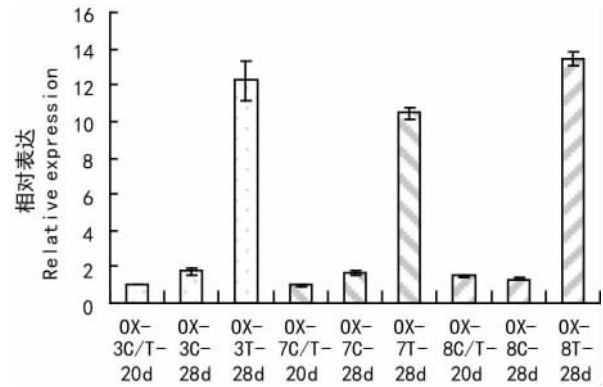


图 6 外源 DEX 诱导 *GmMIR160A* 过表达 用 DEX ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和对照溶液处理展开 20 d 的第一复叶,共处理 8 d,进行定量分析。OX-C/T-20 d 表示处理前叶片; OX-C-28 d 表示对照溶液处理 8 d; OX-T-28 d 表示 DEX ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 8 d。

Fig. 6 Over-expression of *GmMIR160A* by spraying DEX on transgenic leaves The first trifoliolate leaves expanding for 20 d from different transgenic lines (OX-3, OX-7 and OX-8) were sprayed with DEX ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or solution without DEX for 8 d and then prepared for qRT-PCR assays. OX-C/T-20 d indicates that the trifoliolate leaves expand for 20 d before treatment; OX-C-28 d indicates that the trifoliolate leaves were sprayed with ethanol solution for 8 d; OX-T-28 d means that the trifoliolate leaves were sprayed with DEX ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 8 d.

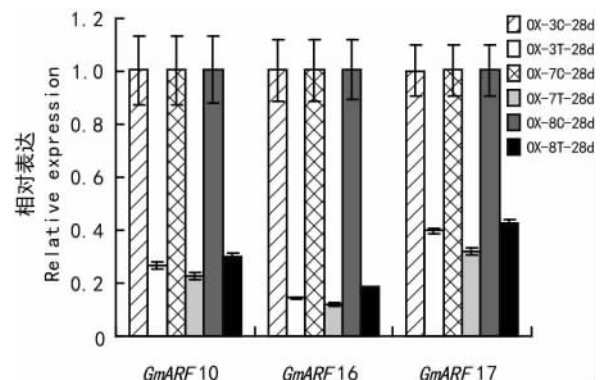


图 7 *GmMIR160A* 过表达抑制其靶基因表达 取样方法同图 6。下同。

Fig. 7 Over-expression of *GmMIR160A* suppresses transcription of its targets Samples are the same as Fig. 6. The same below.

长期第一复叶展开 20 d 后,叶片已开始出现衰老生理特征,随大豆进一步发育(28 d),该叶片衰老程度更为明显,出现叶绿素含量下降和 PSII 的降低(图 8,图 9),但当用化学诱导 *GmMIR160A* 过表达后,这些叶片具有较高的叶绿素含量(图 8),较强的最大光量效率(F_v/F_m)(图 9)。此外, *GmMIR160A* 过表达引起大豆叶片衰老标记基因 *GmCYSP1* 表

达下调(图 10)。这些现象表明 *GmMIR160A* 直接参与了大豆叶片衰老过程的调控。

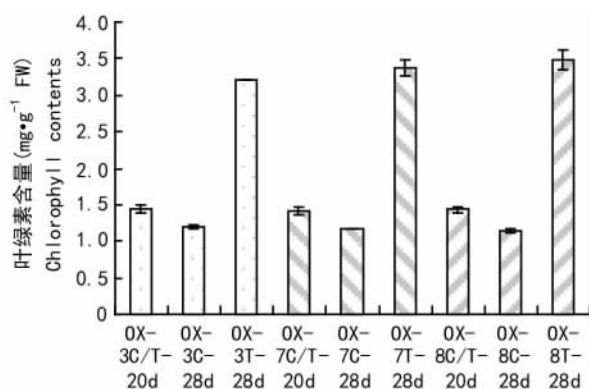


图 8 *GmMIR160A* 过表达对大豆叶片叶绿素含量的影响
Fig. 8 Effects of overexpression of *GmMIR160A* on chlorophyll contents in transgenic leaves

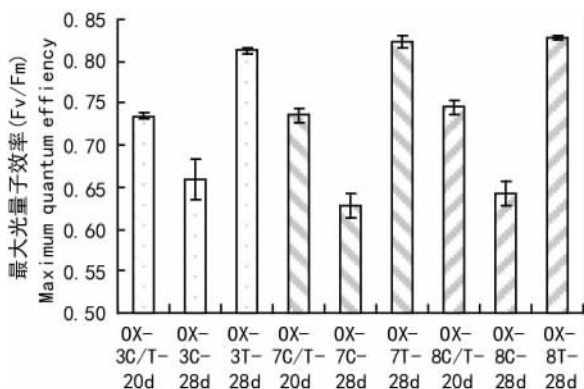


图 9 *GmMIR160A* 过表达对大豆叶片最大光量子效率的影响

Fig. 9 Effects of overexpression of *GmMIR160A* on maximum quantum efficiency (Fv/Fm) in transgenic leaves

3 讨论与结论

大豆基因组测序已经完成 (Schmutz *et al.*, 2010),大豆的遗传转化方法比较成熟,如通过子叶节转化,其转化效率最高可达 10% (Paz *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006),这为反向遗传学方法研究基因功能提供了便捷。由于大豆为古多倍体 (Paeopolyploid),其基因组含有 6 个 *GmMIR160* 基因,分别为 *GmMIR160A-F*,基因功能冗余现象势必存在,所以利用基因缺失突变方式研究他们的功能较为困难。过表达可以从基因获得性功能角度来探究基因的功能 (Aoyama *et al.*, 1997)。

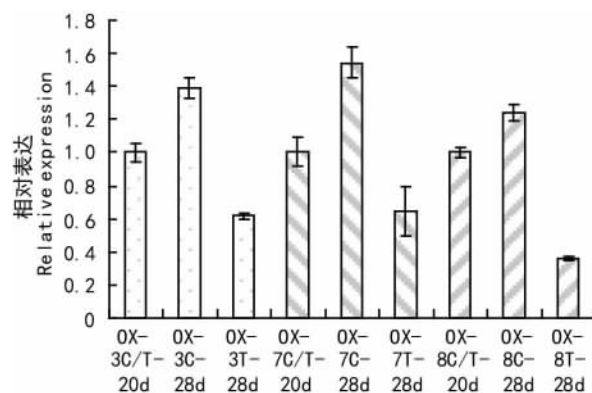


图 10 *GmMIR160A* 过表达抑制叶片衰老标记基因的表达

Fig. 10 Over-expression of *GmMIR160A* suppresses transcription of *GmCYSP1* in transgenic leaves

大豆叶片自然衰老和人工诱导衰老中, *GmMIR160A* 表达随衰老进程而逐渐增加,表明其为衰老相关基因。 *GmMIR160* 的靶基因 *GmARFs* 是生长素信号转导重要组分,外源生长素可在 20 min 内诱导 *GmMIR160A* 的表达,表明 *GmMIR160A* 是生长素的快速响应基因。进一步分析靶基因 *GmARFs* 的时空表达模式将有助于理解 *GmMIR160* 在叶片发育中的调节功能,这部分工作目前正在进行中。

大豆营养生长期 (V) 第一复叶展开 20~28 d,叶绿素含量和最大光量子效率都明显下降,叶片衰老基因表达上调,表明叶片衰老已经启动并进行;相同时期 *GmMIR160A* 过表达第一复叶的衰老明显受到抑制,表现为叶绿素升高、最大光量子效率增强且衰老标记基因 *GmCYSP1* 明显抑制,充分证明 *Gma-miR160* 作为负调节因子直接参与了大豆叶片衰老进程。此外, *GmMIR160A* 过表达直接导致靶基因 *GmARF10/16/17* 的表达下调,表明大豆中 *GmMIR160A* 通过抑制靶基因的表达参与调控叶片衰老的发育进程。

过表达 *GmMIR160A* 延缓了叶片衰老且抑制 *GmARFs* 的表达,可以想象敲减表达 *GmARFs* 的转基因植株将会一定程度地抑制叶片的衰老,而抗降解表达的转基因植株 (*mGmARFs*) 必将加速叶片的衰老进程,相关实验正在进行中。

参考文献:

Aoyama T, Chua NH. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants[J]. *Plant J*, 11(3):

- 605—612
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, *et al.* 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, **42**(4):567—585
- Dharmasiri N, Estelle M. 2004. Auxin signaling and regulated protein degradation[J]. *Trends Plant Sci*, **9**(6):302—308
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, *et al.* 2005. Auxin Response Factor1 and Auxin Response Factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, **132**(2):4 563—4 574
- Fehr, WR, Caviness, CE, Burmood DT, *et al.* 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill[J]. *Crop Sci*, **11**(6):929—931
- Gan S, Amasino RM. 1997. Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence[J]. *Plant Physiol*, **113**(2):313—319
- Hou K, Wu W, Gan S. 2013. SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in promotion of leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, **161**(2):1 002—1 009
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, *et al.* 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **103**(3):814—819
- Kepinski S, Leyser O. 2005. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. *Nature*, **435**(7041):446—451
- Kulcheski F, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno A, *et al.* 2010. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean[J]. *Analyt Biochem*, **406**(2):185—192
- Li Z, Peng J, Wen X, *et al.* 2013. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, **25**(9):3 311—28
- Li XP, Gan R, Li PL, *et al.* 2006. Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence[J]. *Plant Mol Biol*, **61**(6):829—844
- Lim PO, Lee IC, Kim J, *et al.* 2010. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity[J]. *J Exp Bot*, **61**(5):1 419—1 430
- Leyser O. 2006. Dynamic integration of auxin transport and signaling[J]. *Current Biol*, **16**(11):424—433
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, *et al.* 2007. Repression of Auxin Response Factor10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages[J]. *Plant J*, **52**(1):133—146
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, *et al.* 2004. MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems[J]. *Development*, **131**(17):4 311—4 322
- Mallory AC, Barrel DP, Bartel B. 2005. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* Auxin Response Factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes[J]. *Plant Cell*, **17**(5):1 360—1 375
- Nodine MD, Bartel DP. 2010. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis[J]. *Genes & Dev*, **24**(23):2 678—2 692
- Paz MM, Shou HX, Guo ZB, *et al.* 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. *Euphytica*, **136**:167—179
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, *et al.* 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. *Plant Cell Rep*, **25**(3):206—213
- Reed JW. 2001. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*[J]. *Trends Plant Sci*, **6**(9):420—425
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu JH, *et al.* 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation [J]. *Trends Plant Sci*, **12**(7):301—309
- Schmutz J, Cannon B, Schlueter J. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*, **463**(7 278):178—183
- Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, *et al.* 2001. Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin[J]. *Plant Cell*, **13**(12):2 809—2 822
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, *et al.* 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase[J]. *Nature*, **446**(7 136):640—645
- Van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, *et al.* 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence[J]. *Plant Physiol*, **141**(2):776—792
- Voinnet O. 2009. Origine, biogenesis, and activity of plant microRNAs[J]. *Cell*, **136**(4):669—687
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, *et al.* 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, **17**(8):2 204—2 216
- Wingler A, Mare SM, Pourtau N. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence[J]. *New Phytol*, **161**:781—789
- Wingler A, Brownhill E, Pourtau N. 2005. Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence[J]. *J Exp Bot*, **56**(421):2 897—2 905
- Xiao S, Dai LY, Liu FQ, *et al.* 2004. COS1: An *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant senescence and defense[J]. *Plant Cell*, **16**(5):1 132—1 142
- Yang X, Lee S, So JH, *et al.* 2004. IAA1 protein encoded by AXR5 and is substrate of SCF^{TRIM}[J]. *Plant J*, **40**(5):772—782