

大豆生长素响应因子*GmARF16*参与调节 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院, 资源植物生物学安徽省重点实验室, 淮北 235000)

摘要 生长素响应因子(auxin response factors, ARFs)通过调节下游靶基因广泛参与植物生长发育过程, 但ARFs如何调控植物叶片衰老的分子机制还不清楚。该文首先利用实时荧光定量PCR(qPCR)技术, 分析大豆生长素响应基因*GmARF16*在叶片自然衰老、人工黑暗诱导衰老、外源植物生长素IAA处理条件下的表达模式, 结果表明, 该基因与叶片衰老调控密切相关, 并且属于生长素的原初响应基因。为了进一步验证*GmARF16*基因的功能, 采用农杆菌转化方法分别获得基因敲减(*GmARF16-RNAi*)和抗降解表达(*mGmARF16*)的转基因大豆植株。与非转基因对照相比, *GmARF16-RNAi*转基因大豆植株的叶片叶绿素含量和最大光量子效率(Fv/Fm)显著提高, 叶片衰老标记基因(*GmCYSPI*)的表达受到抑制, 而*mGmARF16*转基因大豆植株则呈现出与*GmARF16-RNAi*转基因大豆植株相反的叶片生理表型。结果表明大豆生长素响应因子*GmARF16*正调节叶片的衰老进程。该研究表明, *GmARF16*在植物生长发育进程中发挥着重要作用。

关键词 生长素响应因子; 小RNA; 基因敲减; 抗降解表达

GmARF16, an Auxin Response Factor, Regulates Leaf Senescence Processes in *Glycine max*

Li Xiaoping*, Zeng Qingfa, Zhang Gensheng, Zhao Juan

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

Abstract Auxin response factors (ARFs) regulate many processes of plant growth and development by activating or repressing their targets through the special domain. However, the molecular mechanism of the ARFs regulating leaf senescence is largely unknown. In this paper, expression pattern of *GmARF16* was examined by quantitative real-time PCR (qPCR). It showed that transcript of *GmARF16* was tightly associated with leaf senescence and exhibited characteristic of the auxin primary response gene. To further investigate the function of *GmARF16*, both the knock down and the resistant-version transgenic soybean plants were created by *Agrobacterium*-mediated transformation. The knock down plants expressing *GmARF16-RNAi* exhibited increasing chlorophyll content, higher maximum quantum efficiency (Fv/Fm) and up-regulated *GmCYSPI*, a soybean senescence marker. In contrast, the

收稿日期: 2014-04-10 接受日期: 2014-08-26

国家自然科学基金(批准号: 30970245)、安徽省教育厅自然科学基金(批准号: kj2007B110)和安徽省高校优秀青年教师基金(批准号: 2007jq1161)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0561-3803637, E-mail: 1244232074@qq.com

Received: April 10, 2014 Accepted: August 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970245), the Natural Science Foundation of Education Department of Anhui Province (Grant No.kj2007B110) and the Foundation for Outstanding Young Teachers in Colleges and Universities in Anhui Province (Grant No.2007jq1161)

*Corresponding author. Tel: +86-561-3803637, E-mail: 1244232074@qq.com

网络出版时间: 2014-12-01 17:24 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0122.html>

leaves of resistant-version transgenic plants expressing *mGmARF16* showed opposite phenotypes compared with non-transgenic controls, indicating that *GmARF16* regulates leaf senescence as a positive regulator. The results of this work highlight the role of *GmARF16* in plant development.

Key words auxin response factors; microRNAs; knock down; resistant-version

叶片衰老是植物叶片发育的最后阶段, 是受到细胞内外多种因素(因子)影响的有序细胞降解过程^[1-2]。植物激素是叶片衰老的重要调节因子, 如乙烯和细胞分裂素被认为是叶片衰老的正负调节因子, 它们通过各自的信号转导来促进或延缓叶片衰老进程^[3-6]。目前, 生长素在植物叶片衰老过程中的作用机理研究还不是很深入, 尤其是作为正调节子的证据还不够充分。近年来, 通过突变体筛选, 在拟南芥中发现23个生长素响应因子(auxin response factors, ARFs), 其中ARF2参与调控植物叶片衰老, 暗示生长素直接参与叶片的衰老调控^[7-8], 但生长素如何通过细胞信号组分调控衰老进程, 目前还不清楚。

在组织中, 生长素合成部位和功能部位是不完全重合的, 生长素的极性运输解决了这种不重合性^[9-10]。生长素由合成部位运输到功能部位后, 通过一系列细胞信号转导事件来完成其生理调控。生长素受体TIR1、Aux/IAA转录因子、生长素响应因子(ARFs)和具有生长素响应元件(AuxREs, TGTCNC)的下游靶基因等是组成生长素细胞信号转导的主要组分^[11-13]。当生长素含量很低时, Aux/IAA蛋白与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蛋白与TIR1结合在一起, 形成SCF^{TIR1}-生长素-Aux/IAA复合体, 降解Aux/IAA蛋白, 解除Aux/IAA对ARFs的抑制, ARFs与下游AuxRE结合完成生长素的发育调控功能^[14-16]。

在细胞中, ARFs一些成员除了受Aux/IAA的调节外, 还受到转录后水平的miRNA的调控。MicroRNAs(miRNA)是一些基因转录后调控的主要作用方式, 主要通过负调控来抑制靶基因表达, 即在转录后水平介导靶基因mRNA的裂解或抑制翻译来调节植物基因的表达^[17]。拟南芥基因组中有三个miR160基因(*At-miR160a, b, c*), 它们的靶基因有三个, 分别为*AtARF10*、*AtARF16*和*AtARF17*。*miR160*对*ARF10*和*ARF16*的调控参与根冠的形成和发育。通过增加*ARF10*和*ARF16*转录本与*miR160*错配碱基数目, 转化野生型拟南芥得到的抗降解植

株(*mARF10/16*, resistant-version), 其*ARF10*和*ARF16* mRNA降解受到抑制, 叶片发育和生殖生长都受到一定程度的影响^[18]。另外, 抗降解表达*mARF17*转基因植株通过调节生长素诱导基因*YDK1/GH3.2*、*GH3.3*、*GH3.5*和*DFL1/GH3.6*的表达来抑制其幼苗侧根的生长^[19-20]。

大豆基因组具有6个*Gm-miR160*基因(*Gm-miR160 a-f*), 它们编码的小RNA可以识别并调控12个靶基因的转录活性。*GmARF16*基因(*Glyma13g20370.1*, 以下统一称为*GmARF16*)是*Gm-miR160*的靶基因。为了进一步明确该基因功能, 我们分析该基因在叶片自然衰老和人工黑暗诱导衰老体系中的表达模式, 并通过基因敲减和抗降解表达来进一步研究*GmARF16*在叶片衰老中的作用。大豆属于单次性结实衰老植物^[21], 叶片衰老程度和快慢直接影响大豆的产量^[22], 研究大豆叶片衰老的分子调控机制具有深远的应用价值。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种、质粒及相关培养基 菌种 *E.coli* DH5a; 农杆菌LB4404; 植物表达载体pGWB433-M1, 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 一般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; 长片段高保真KOD酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; TOPO TA Cloning和LR重组反应试剂盒购自Invitrogen公司; Real-time PCR试剂盒购自Bio-Rad。高纯质粒小量提取试剂盒购自威格拉斯生物技术公司, 其他试剂均为上海生工产品。

1.1.3 引物 根据<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>提供的*GmARF16*序列并结合NCBI数据库相应EST, 设计各引物进行定量PCR和相应载体构建(表1)。qGmARF16-F1/R1引物扩增片段大小为180 bp。内标为大豆*ACT2/7*基因, *ACT2/7-F1/R1*引物扩增片段大小为119 bp。*GmCYSPI*作为大豆叶片衰老的标记基

表1 定量PCR、构建载体和鉴定转基因的引物

Table 1 Primers for Real-time PCR, the binary construction and identification of transgenic plants

引物 Primers	序列 Sequences	用途 Usage
qGmARF16-F1	5'-CTT GCT TTT ATG TAT TCA CT-3'	Quantitative PCR
qGmARF16-R1	5'-TTC AAT GCA AGA TTA AAT TGT A-3'	Quantitative PCR
GmARF16-F1	5'-cac cGT ACT CAC TAT CGT AGG GTT TGA AT-3'	Construction
GmARF16-R1	5'-TTC AAT GCA AGA TTA AAT TGT AAT AGC AAA TA-3'	Construction
mGmARF16-F2 ^a	5'-GCT <u>GGT GGt</u> ATG CAG <u>GGa GeC cGG</u> CAT GCT CAT TAT GGT-3'	Construction
mGmARF16-R2 ^a	5'-TCA TGC <u>CgG gCt</u> CCC TGC <u>ATa CCA</u> CCG CAG GAG TAC TT-3'	Construction
GmARF16-5R1 ^b	5'- <u>CTC GAG GGA TCC</u> AGC CTA TTC TGT TTT TTT CCC C-3'	Construction
GmARF16-RNAi-F1 ^b	5'-CCT <u>GGT ACC ATC GAT</u> GTA CAG ATA GTT CAC GAA GTC TCA-3'	Construction
GmARF16-RNAi-R1 ^b	5'- <u>CTC GAG GGA TCC</u> GTC CTC CAC CTT TTT CCC C-3'	Construction
GmARF16-IF1	5'-GAT TGG TTT GTA AGC AGG TAA AAA-3'	Transgenic identification
GmARF16-IR1	5'-ACG GTG ATA TCG TCC ACC CA -3'	Transgenic identification
GmCYSP1-F1	5'-TCT CCT AAA GAT GAA CTT TGA ATG CT-3'	Quantitative PCR
GmCYSP1-R1	5'-TCA CTC AAA CCA ACT TGA AAT ATT TA-3'	Quantitative PCR
ACT2/7-F1	5'-CTT CCC TCA GCA CCT TCC AA-3'	Quantitative PCR
ACT2/7-R1	5'-GGT CCA GCT TTC ACA CTC CAT-3'	Quantitative PCR

a: 用于构建抗降解表达载体, 标有下划线的序列为*Gm-miR160*靶序列, 小写字母表示不配对碱基; b: 用于构建基因敲减载体, 标有单下划线的序列是引入正向片段的内切酶位点, 标有双下划线的序列是引入反向片段的内切酶位点。

a: primers were used for generating resistant version vectors and the sequence underlined is the target of *Gm-miR160*; The lower-case letters indicated the non-matched bases; b: primers were used for generating gene knock down; The sequence single-underlined is the restriction enzymes for introducing sense DNA fragment; The sequence double-underlined is the restriction enzymes for introducing anti-sense DNA fragment.

因^[23], GmCYSP1-F1/R1引物扩增片段为62 bp。转基因鉴定引物GmARF16-IF1/IR1扩增片段为730 bp。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR

RNA提取和反转录按文献[5]进行, 反转录产物通过Bio-Rad定量PCR仪(MiniOpticon™)进行定量。定量引物如表1所示。对于叶片自然衰老条件下基因的表达, 取营养生长期(V1)至生殖生长期(R5)最先出现的完全展开第1复叶, 进行定量PCR; V指的是营养生长期, V1、V2、V3表示分别表示营养时期第1、第2和第3三出复叶展开时间。Vn中的最大值n随培养条件的变化而变化。R指的是生殖期, R1表示刚长出第1朵花, 为花始期; R2表示第1朵花已经打开, 为开花期; R3表示植株顶端长出5 mm长的豆荚, 为结荚期; R4表示植株顶端长出2 cm长的豆荚, 为全荚期; R5表示植株顶端豆荚中出现长度为3 mm的种子, 为结实期^[24]。对于转基因植株基因表达分析, 分别选取展开3, 20, 40 d的第

一复叶, 进行定量PCR。离体叶片衰老处理: 选取V1期展开3 d的第一复叶, 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, 最长处理10 d, 提取总RNA并分析。外源生长素处理: 用10 μmol/L生长素IAA喷在完全展开的第一复叶上^[25], 每隔5 min 取下叶片, 提取总RNA并分析。所有实验进行至少三次重复。

1.2.2 TOPO克隆和LR重组反应

按照Invitrogen公司的TOPO TA Cloning方法进行, 切胶回收相应片段与TOPO载体按3:1混合(10 μL), 用拓扑异构酶在22 °C反应5~10 min, 取反应产物1~2 μL(pCR2.1-mGmARF16)用电击转化法转化大肠杆菌感受态细胞*E.coli* DH5a(Bio-Rad, 2.5 kv/um/ms)。转化得到的阳性克隆(卡那霉素抗性, Kan^R), 经PCR和酶切鉴定后, 送上海生工生物工程有限公司测序, 测序正确的克隆用于下游LR重组反应(简称LR反应)。LR

反应时,按照 Gateway[®] LR重组方法(Invitrogen)进行: 1~5 μL (100 ng) pCR2.1-m*GmARF16*或pCR2.1-*GmARF16*-RNAi, 1 μL (100 ng)目标载体 pGWB433-M1, 2 μL LR反应缓冲液, 2 μL LR重组酶。用 TE(pH8.0)调整体积达10 μL , 室温反应1 h(20~23 $^{\circ}\text{C}$)。取反应产物1~2 μL (*pGmARF16::mGmARF16*和*pGmARF16-RNAi*)用电击转化法转化大肠杆菌感受态细胞 *E.coli* DH5a(Bio-Rad, 2.5 kv/ $\mu\text{m}/\text{ms}$)。转化后的大肠杆菌重悬于1 mL LB培养基中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速100 r/min条件下培养1 h, 然后取50~100 μL 涂在具有卡那霉素和潮霉素(Hyg^R)双抗的LB培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养16 h。挑选已分散开的单克隆, 经PCR和酶切鉴定稳定表达的阳性克隆, 用于农杆菌的转化。

1.2.3 *pGmARF16::mGmARF16*和*pGmARF16-RNAi*二元表达载体构建 *miR160*通过不完全互补抑制靶基因的表达, 修饰靶基因的识别位点可形成特殊形式的过表达——抗降解表达^[19]。*Gm-miR160*识别位点在*GmARF16*的CDS区, *GmARF16*与*Gm-miR160*识别区只有一对碱基不配对。构建*pGmARF16::mGmARF16*二元表达载体, 根据遗传密码子的简并性, 我们把不配对碱基对数提高到4对, 但保持编码蛋白质序列不发生改变, 通过重叠PCR方法把模板连接起来, 进入TOPO克隆。敲减表达的载体构建借助pHANNIBAL中间体并按文献[3]进行并稍加修改: 首先, TOPO克隆*GmARF16*启动子(翻译起始ATG上游-1 907至-1 bp), 并在*GmARF16*-5R1引物中引入酶切位点*Xho* I和*Bam*H I, 然后通过酶切方式引入pHANNIBAL-*GmARF16*-RNAi中正反向片段。正反向片段中间含有丙酮酸磷酸激酶PDK内含子序列。鉴定成功的TOPO克隆分别与pGWB433-M1进行LR重组反应, 形成*pGmARF16::mGmARF16*和*pGmARF16-RNAi*二元表达载体(图1)。

1.2.4 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LB4404(Bio-Rad, 2.5 kv/ $\mu\text{m}/\text{ms}$)。转化后的农杆菌重悬于1 mL YEP培养基中, 在28 $^{\circ}\text{C}$ 、转速200 r/min条件下, 培养2~3 h, 然后取50~100 μL 涂在具有卡那霉素和潮霉素(Hyg^R)双抗YEP培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 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, 用于转化大豆。

1.2.5 大豆叶片生理参数测定 大豆在具23~26 $^{\circ}\text{C}$ 和16 h白天/8 h黑夜光周期的人工培养室中繁殖生长。测量植株为T3代转基因纯合植株和相应对照。测量的叶片为各基因型植株展开3, 20, 40 d的第一复叶。叶片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g含有多少mg叶绿素来计量^[26]。最大光量子效率PSII(Fv/Fm)用脉冲调制荧光仪进行测定(FMS-2, Hansatech, King's Lynn, UK)^[27]。

1.2.6 大豆转化 以科丰34品种大豆为材料, 采用子叶节方法, 转化过程按文献[28-29]并加以调整。各转化培养基的成分为: (1)萌发培养基(Gamborg B5 base salt+Sucrose 30 g/L, pH5.8, Agar 6.5 g/L); (2)共培养培养基(1/10 Gamborg B5 base salt+Gamborg B5 Vitamin+MES 3.9 g/L+Sucrose 30 g/L+BAP 1.8 mg/L+GA3 0.2 mg/L+AS 0.1 g/L+DTT 200 mg/L+Cys 400 mg/L, pH5.2, Agarose 4.5 g/L); (3)芽诱导培养基(Gamborg B5 base salt+Gamborg B5 Vitamin+MES 1.2 g/L +Sucrose 30 g/L+BAP 1.8 mg/L+Glufosinate ammonium 20mg/L+Cef 200 mg/L+Carb 500 mg/L, pH5.4, Phytigel 3.0 g/L); (4)生根培养基(Gamborg B5 base salt+Gamborg B5 Vitamin+MES 1.2 g/L+Sucrose 30 g/L+IAA 1 mg/L+Glufosinate ammonium 10 mg/L, pH5.8, Agar 6.5 g/L)。

1.2.7 数据统计 实验数据以“均数 \pm 标准差”表示。利用Student's *t*检验进行数据分析。

2 结果

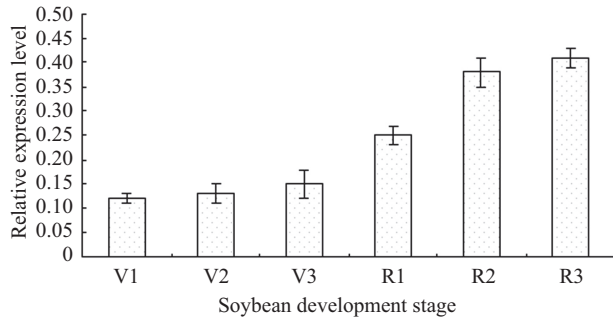
2.1 *GmARF16*表达模式

衰老相关基因的表达随叶片衰老呈现出一定的模式。为了研究*GmARF16*在叶片衰老过程的表达模式, 我们在*GmARF16*的3'端设计一对引物进行定量PCR分析。结果显示, *GmARF16*在叶片发育早期就有表达, 随着叶片成熟至衰老, 其表达量逐渐增加(图1)。此外, *GmARF16*在离体叶片衰老系统中表达逐渐提高(图2), 表明*GmARF16*表达受衰老诱导, 可能是衰老相关基因。在外源生长素处理下, 一些基因表达会在很短时间(10~30 min)内就达到稳态的水平, 这些基因为生长素原初响应基因。用10 $\mu\text{mol/L}$ 的IAA处理大豆展开3 d的第1复叶, 发现*GmARF16*的转录在15 min内就显著提高并保持一定的水平(图3), 表明*GmARF16*的表达受生长素的诱导, 并且是生

长素的原初响应基因。*GmARF16*对生长素这种响应机制为外源生长素调控叶片衰老提供了一定的分子证据。

2.2 基因敲减表达 *GmARF16*(*GmARF16-RNAi*) 延缓叶片衰老

采用RNA干扰可以敲减基因的表达,检测内源



V: 大豆营养生长期; R: 大豆生殖生长期。

V: vegetable growth stage of soybean; R: reproductive growth stage of soybean.

图1 *GmARF16*在大豆不同发育时期第一复叶中的表达变化
Fig.1 Expression pattern of *GmARF16* in the first trifoliate leaves at different development stages of soybean

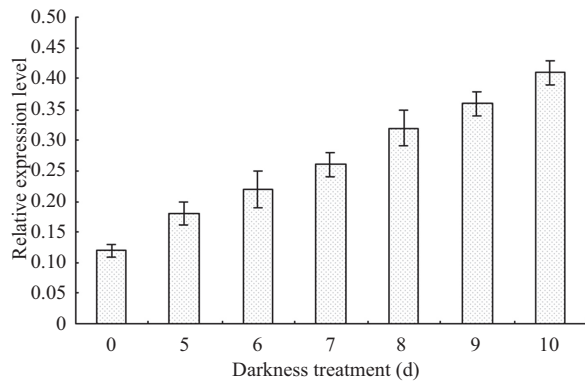


图2 黑暗处理大豆叶片诱导*GmARF16*的表达

Fig.2 Expression of *GmARF16* induced by darkness treatment

靶基因表达下调后的表型变化,从而探究目标靶基因的生物学功能。我们在*GmARF16*的3'端选取一段该基因特异片段来构建RNAi双元表达载体(图4),转化野生型大豆。*GmARF16*敲减表达的转基因大豆(株系R3、R6和R7)叶片颜色明显加深,进一步分析发现,转基因叶片具有较高的叶绿素含量(图5A)和较强的最大光量效率(Fv/Fm)(图5B)。此外,*GmARF16*敲减表达抑制大豆叶片衰老标记基因*GmCYSPI*(图5C)。这些实验表明,*GmARF16*参与了大豆叶片衰老过程的调控。

2.3 抗降解表达 *GmARF16*(*mGmARF16*)加速叶片衰老进程

通过重叠PCR方法构建抗降解表达载体并对大豆进行转化,发现*mGmARF16*转基因大豆(株系L1、L3和L7)(图1)呈现出与*GmARF16*基因敲减相反的表型,包括降低叶片叶绿素含量(图6A)、减弱最大光量子效率(图6B)和上调叶片衰老标记基因(图6C),表明大豆生长素响应因子*GmARF16*是叶片衰老的正调节子。

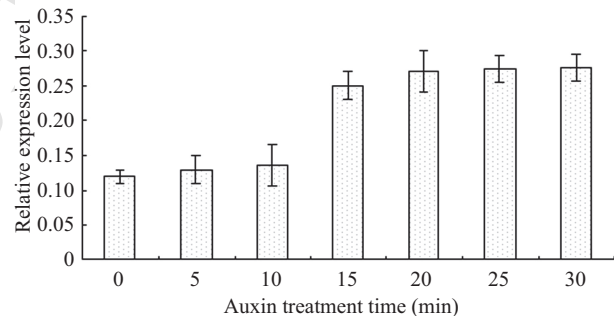
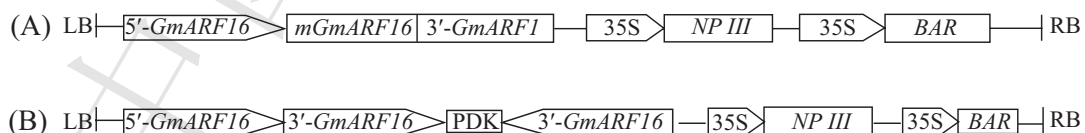


图3 外源生长素快速诱导*GmARF16*的表达

Fig.3 Expression of *GmARF16* was induced quickly by exogenous applied auxin

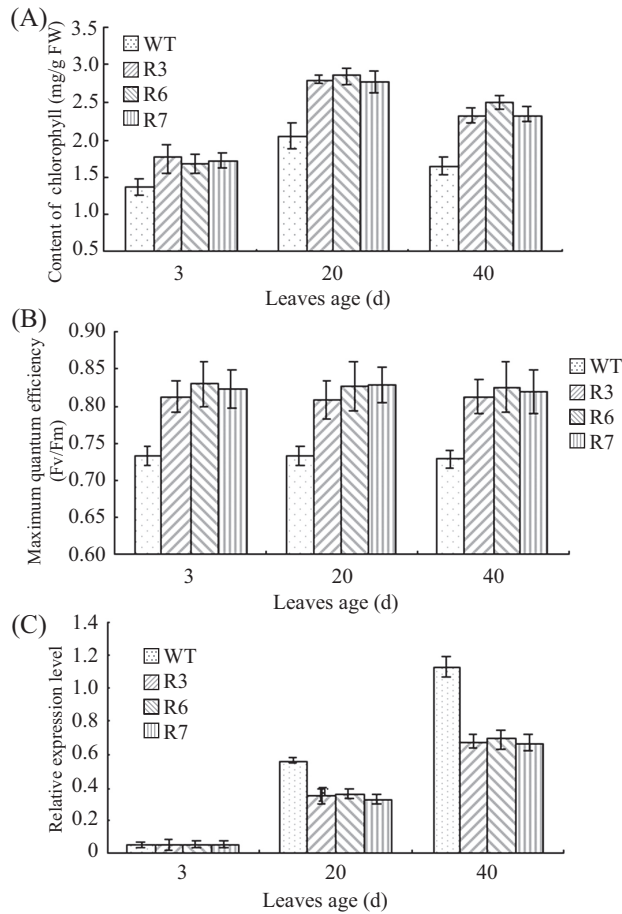


A: 抗降解表达载体T-DNA结构; B: 敲减表达载体的T-DNA结构。35S: 花椰菜CaMV病毒启动子; *NP III*: 卡那霉素筛选标记基因; *BAR*: 抗草胺磷基因; LB: 左边界; RB: 右边界。

A: schematic diagram of T-DNA in *GmARF16* resistant-version vector; B: schematic diagram of T-DNA in *GmARF16* knock down vector. 35S: promoter of cauliflower mosaic virus; *NP III*: kanamycin selective gene; *BAR*: glufosinate-ammonium selective gene; LB: left border; RB: right border.

图4 *GmARF16*抗降解和敲减表达双元载体T-DNA结构示意图

Fig.4 Schematic diagrams of T-DNA in *GmARF16* resistant-version and the knock down binary vector



A: *GmARF16*敲减表达增加叶片叶绿素含量; B: *GmARF16*敲减表达提高叶片最大光量子效率; C: *GmARF16*敲减表达抑制衰老标记基因*GmCYSP1*的表达。WT: 野生型; R3/6/7: *GmARF16*敲减表达转基因株系*GmARF16-RNAi-R3/6/7*。

A: knock down of *GmARF16* increased content of leaf chlorophyll; B: knock down of *GmARF16* enhanced maximum quantum efficiency (Fv/Fm); C: knock down of *GmARF16* suppressed expression of a soybean senescence marker gene *GmCYSP1*. WT: wild type; R3/6/7: the different transgenic lines of *GmARF16* knock down.

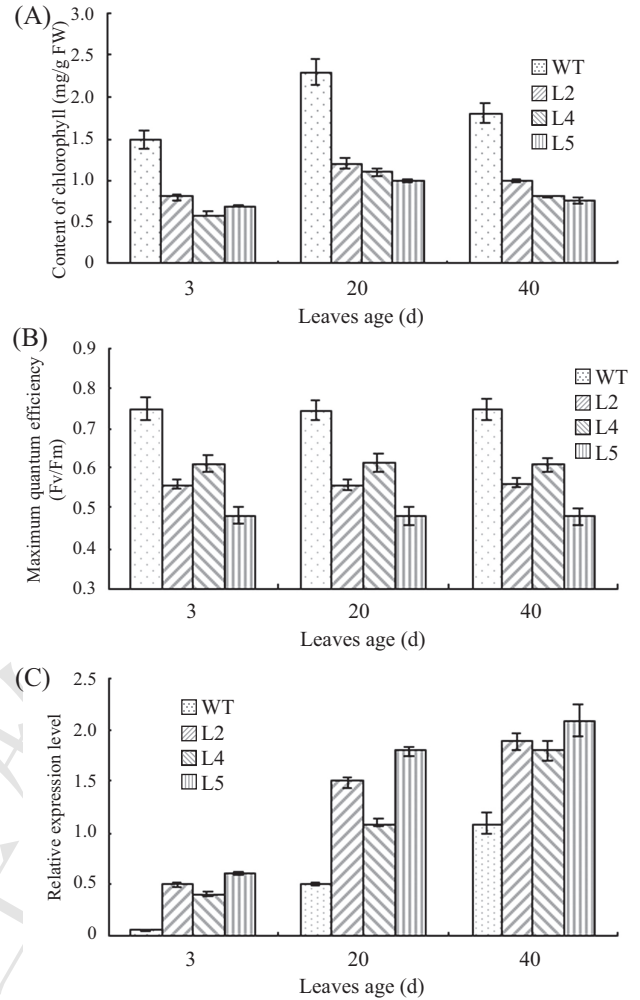
图5 *GmARF16*敲减表达延缓大豆叶片衰老

Fig.5 Knock down of *GmARF16* delayed soybean leaves senescence

3 讨论

目前,大豆全基因组测序已经完成^[30],这为反向遗传学方法研究大豆基因功能提供了坚实的数据平台。此外,大豆的遗传转化效率有了显著提高,如子叶节法转化大豆最高可达10%左右^[27-28],这又为研究大豆的基因功能提供了便捷。

大豆为单次性结实衰老植物,叶片生长明显受植株发育进程影响。在R1时期(花始期),第1三出复叶呈现明显的衰老表型(症状)。为了防止植株生殖发育信号启动离体叶片的衰老进程,在黑暗诱导



A: *GmARF16*抗降解表达减少叶片叶绿素含量; B: *GmARF16*抗降解表达削弱叶片最大光量子效率; C: *GmARF16*抗降解表达促进衰老标记基因*GmCYSP1*的表达。WT: 野生型; L2/4/5: *GmARF16*抗降解表达转基因株系*mGmARF16-L2/4/5*。

A: *mGmARF16* decreased content of leaf chlorophyll; B: *mGmARF16* weakened maximum quantum efficiency (Fv/Fm); C: *mGmARF16* increased expression of a soybean senescence marker gene *GmCYSP1*. WT: Wild type; L2/4/5: the different transgenic lines of *mGmARF16*.

图6 *mGmARF16*加速大豆叶片衰老

Fig.6 *mGmARF16* accelerated soybean leaves senescence

离体叶片衰老实验中,采用V1时期展开3 d的三出复叶。无论在自然衰老还是人工黑暗诱导衰老系统中,*GmARF16*表达明显受到衰老诱导,表明其为衰老相关基因(图1和图2)。自然生长状态下,敲减表达*GmARF16*明显延缓叶片衰老进程(图5),而抗降解表达则加速叶片衰老的过程(图6),进一步说明*GmARF16*作为正调节因子参与大豆叶片衰老进程。*GmARF16*敲减表达植株的3 d叶片*GmCYSP1*表达量很低,与对照组差异很小,说明3 d叶片中*GmARF16*表达量下调不足以抑制*GmCYSP1*表达或*GmCYSP1*

表达须维持在较低的阈值水平之上；而抗降解表达的3 d叶片衰老标记基因*GmCYSPI*表达量比对照显著增加，暗示过多的*GmARF16*提前启动叶片衰老进程。

*GmARF16*表达分析表明，该基因在多个器官中表达，但表达量在各器官间有较大差异(待发表)。如果用强组成型表达启动子(烟草花椰菜病毒，35S)来驱动*mGmARF16*的表达，*GmARF16*在某些器官组织中大量积累且抑制其生长，这样就有可能得不到转基因植株。我们在筛选拟南芥35S::*mAtARF16*转基因植株时，发现在筛选培养基中出现有少量抗性苗，移栽到正常培养基或土壤中不能成活，而用*AtARF16*本身的启动子驱动，可以得到大量转基因植株，说明应用35S强启动子可能不适合驱动*mGmARF16*的表达。因此，我们均使用*GmARF16*自身启动子驱动来构建基因敲减和抗降解表达载体。

考虑到*GmARF16*基因组序列较长，用限制性内切酶酶切连接很难获得目标载体，因此我们整合TOPO载体和LR反应来构建二元载体*pGmARF16::mGmARF16*。TOTO载体很方便进行PCR片段克隆，只要在PCR正向引物5'端引入CACC就可以把片段克隆进去。pGWB433-M1拥有LR重组反应元件，具有三个细菌抗性基因，分别为氯霉素、卡那霉素和潮霉素抗性基因，氯霉素抗性基因是负筛选基因，可以去除LR反应中过剩的pGWB433-M1，而卡那霉素和潮霉素抗性基因是正筛选基因，可以去除LR反应中过剩的TOPO载体。另外，为了使下游转基因筛选过程易于操作，我们对二元表达载体进行简单改造，增加草胺膦抗性标记基因，以便通过喷洒草甘膦除草剂对转基因大豆进行复筛。

参考文献 (References)

- Gan S, Amasino RM. Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol* 1997; 113(2): 313-9.
- Buchanan-Wollaston V. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 1997; 48(2): 181-99.
- Li XP, Gan R, Li PL, Ma YY, Zhang LW, Zhang R, *et al.* Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Mol Biol* 2006; 61(6): 829-44.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; 42(85): 567-85.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flüge UI, Kunze R. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* 2006; 141(2): 776-92.
- Xu F, Meng T, Li P, Yu Y, Cui Y, Wang Y, *et al.* A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its *Arabidopsis* homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol* 2011; 157(4): 2131-53.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW. *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 2005; 132(20): 4563-74.
- Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR, *et al.* Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot* 2010; 61(5): 1419-30.
- Leyser O. Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Curr Biol* 2006; 16(11): 424-33.
- Dharmasiri N, Estelle M. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 2004; 9(6): 302-8.
- Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 2001; 13(12): 2809-22.
- Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; 435(7041): 446-51.
- Yang X, Lee S, So JH, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Ge L, *et al.* The IAA1 protein encoded by AXR5 and is substrate of SCF(TRII). *Plant J* 2004; 40(5): 772-82.
- Liaccum E, Reed JW. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 2002; 49(3/4): 387-400.
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; 446(7136): 640-5.
- Reed JW. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 2001; 6(9): 420-5.
- Nodine MD, Bartel DP. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev* 2010; 24(23): 2678-92.
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; 17(8): 2204-16.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC. Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 2007; 52(1): 133-46.
- Mallory AC, Barrel DP, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 2005; 17(5): 1360-75.
- Lindoo SJ, Nooden LD. Correlations of cytokinins and abscisic acid with monocarpic senescence in soybean. *Plant Cell Physiol* 1978; 19(6): 997-1006.
- Meng YY, Li HY, Wang Q, Liu B, Lin CT. Blue light-dependent interaction between cryptochrome2 and CIB1 regulates transcription and leaf senescence in soybean. *Plant Cell* 2013; 25(11):

- 4405-20.
- 23 Oh CJ, Lee H, Kim HB, An CS. Isolation and characterization of a root nodule-specific cysteine proteinase cDNA from soybean. *J Plant Biol* 2004; 47(3): 216-20.
- 24 Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. *Crop Sci* 1971; 11(6): 929-31.
- 25 Ludwig-Müller J, Vertocnik A, Town CD. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J Exp Bot* 2005; 56(418): 2095-105.
- 26 Xiao S, Dai LY, Liu FQ, Wang Z, Peng W, Xie D. COS1: An *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant senescence and defense. *Plant Cell* 2004; 16(5): 1132-42.
- 27 Winkler A, Brownhill E, Pourtau N. Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *J Exp Bot* 2005; 56(421): 2897-905.
- 28 Paz MM, Shou HX, Guo ZB, Zhang ZY, Anjan K, Banerjee AK, *et al.* Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 2004; 136(2): 167-79.
- 29 Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 2006; 25(3): 206-13.
- 30 Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J. Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 2010; 463(7278): 178-83.

中国细胞生物学