

miRNA调控大豆根系结瘤及共生固氮的分子机制研究进展

李科学*, 曲德杰, 黄慧梅, 曹金山, 樊仔慧, 李国纪, 王幼宁

华中农业大学植物科学技术学院, 武汉430070

摘要: 大豆籽粒富含蛋白质和油脂, 是一种重要的粮油经济作物。在生长发育过程中大豆需要更多的氮素营养, 现在生产中主要以施用化肥为主。除了从土壤或肥料中获取氮素营养外, 大豆还进化产生根瘤, 通过共生固氮作用吸收生长发育所需的氮素营养。尽管大豆具有天然的共生固氮系统, 但是目前生产上对其利用较少, 对介导大豆共生固氮的分子机制研究较其他模式豆科植物相对薄弱。大豆基因组序列公布以后, 大豆根系结瘤及共生固氮分子机制研究取得了突破性的进展, 特别是miRNA经由表观遗传学方式调控豆科植物菌植互作及根瘤发生发育的机制领域。本文综述了miRNA调控大豆根系结瘤及共生固氮机制方面的进展, 并为后续更深入地开展相关分子机制研究提出策略。

关键词: 大豆; 结瘤; 共生固氮; 分子机制; miRNA

大豆(*Glycine max*)是具有较高营养及经济价值的粮油作物, 其在生长发育过程中对氮素的需求量极大, 氮肥的供应状况显著影响大豆产量。作为豆科植物, 大豆根部特化产生侧生组织——根瘤, 进而通过共生固氮(symbiotic nitrogen fixation, SNF)作用获取生长发育所需的氮素营养。共生固氮是指固氮微生物在固氮酶的催化作用下将空气中游离的氮气转化成植物能吸收的含氮化合物(NH_3 或 NH_4^+)的过程, 其对增加大豆产量、改善品质、减少化肥施用量、节省能源、减少污染及维持自然界中氮素的平衡都具有十分重要的意义。

1 根瘤形成及结瘤因子信号转导

豆科植物根瘤的形成是其实现共生固氮的关键步骤。当土壤中的氮素匮乏时, 根系通过分泌类黄酮类物质吸引根瘤菌聚集在根周围, 并诱导根瘤菌合成和分泌一类多糖信号分子(即结瘤因子, nod factors, NFs), NFs通过激活植物细胞的信号网络引发根瘤菌侵染及根瘤的发生发育过程。经过几十年对豆科植物共生固氮的研究, 现在已经基本清楚根瘤的形成是由两个相对独立的, 但在时空上紧密协调的、遗传上密不可分的生物学过程来完成。一个是根瘤菌侵染植物根表皮细胞尤其是根毛细胞并通过侵染线进入植物, 这个过程主要包括根毛发生明显的变形、弯曲直至形成侵染线以使得根瘤菌成功进入植物细胞; 另一个是在根瘤菌侵染的同时, 在根皮层细胞相应部位的细胞分裂分

化并形成根瘤原基, 根瘤原基逐渐生长发育直至成熟, 成熟后的根瘤具有固氮功能(Ferguson等2010)。

豆科植物的根瘤形成受植物和根瘤菌双方诸多基因的精细调控。目前在豆科植物百脉根(*Lotus japonicus*)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中逐渐明晰了相对保守的结瘤因子信号转导途径(nod factor signaling pathway, NF信号通路), 即根瘤菌释放的NFs由根表皮细胞的LysM型受体接受并由此激活了NF信号通路。在百脉根中, 结瘤因子受体由*LjNFR1*及*LjNFR5*编码(Radutoiu等2003; Madsen等2003), 苜蓿中为*MtNFP* (Arrighi等2006)。在大豆中编码结瘤因子受体蛋白的同源基因包括*GmNFR1 α/β* 及*GmNFR5 α/β* (Indrasumunar等2010, 2011)。当受体识别根瘤菌释放NF后, 可以激活LRR-RLK类受体激酶(LjSYMRK、MtDMI2和GmNORK)及其下游的信号组分, 从而介导了豆科植物根毛或表皮细胞与根瘤菌的互作和侵染线的形成过程(Endre等2002)。近年来, 在苜蓿和百脉根中陆续鉴定到了多个NF信号通路的下游组分, 例如核膜上的阳离子通道LjCASTOR、LjPOLLUX, 核孔蛋白LjNup133、LjNup85、NENA及CNGC15等(Groth等2010; Charpentier等2016), 进一步丰富了经典的NF信号通路。

收稿 2019-04-11 修定 2019-11-04

资助 国家转基因重大专项(2018ZX08009-19B)和国家自然科学基金(31872873)。

* 通讯作者(kexuey@mail.hzau.edu.cn)。

相对而言,在粮油经济作物大豆中的研究相对滞后于豆科模式植物。自基因组序列公布之后,大豆共生固氮分子机制的研究受到了较大推动,其中关于miRNA通过表观遗传学方式参与调控大豆根系结瘤的研究更为显著。本文在总结豆科模式植物百脉根及苜蓿中已报道参与调控结瘤固氮的关键miRNA的基础上,重点对近年来miRNA所介导的大豆根系结瘤及共生固氮的分子机制研究进展进行了总结。

2 miRNA及其作用机制

MicroRNA (miRNA)是由植物产生的长度为21 bp左右的单链非编码小分子RNA,也正是因为其片段极小的特点,其生成机制及生物学功能研究也滞后于功能基因。miRNA在生成后通过序列互补配对原则靶向结合其下游的功能基因,并可能在转录后水平切割靶基因的mRNA或者抑制其翻译进程,从而阻止了靶基因功能的发挥(Rogers和Chen 2013)。

miRNA已被证明参与调节植物多个生长发育和逆境响应过程,也在精细调控根瘤菌对植物的侵染和根瘤形态建成中起作用。相关工作在苜蓿和百脉根中开展得较为系统和深入,例如miR169、miR166及miR171等多个miRNA均被系统证明可参与调控苜蓿或者百脉根的根瘤形成过程(Combier等2006; Boualem等2008; Hofferek等2014)。Tsikou等(2018)证明在百脉根叶子中产生的miR2111可通过韧皮部传递到根部,进而直接调控其靶基因*TML* (*Too Much Love*)的RNA丰度,从而促进了根瘤菌的侵染过程,并最终导致根瘤数目增加。在大豆中也有多项研究结果证明miRNA通过表观遗传学方式调控了根系的结瘤及共生固氮过程(表1)。

3 miRNA-靶基因分子模块参与调控大豆根系结瘤及共生固氮的研究进展

3.1 通过高通量测序技术挖掘在大豆根中响应根瘤菌侵染的miRNAs

在2010年大豆基因组序列公布之前,对大豆

表1 已验证参与调控大豆根系结瘤的miRNA
Table 1 miRNAs associated with nodulation in soybean

miRNA	在结瘤固氮中的作用	靶基因	靶基因注释	参考文献
miR482	过表达和 <i>ENOD40</i> 启动子诱导表达增加根瘤数目	<i>MsK4</i> (<i>Glyma12g28730</i>)	编码GSK-3类蛋白激酶	Li等2010
miR1515	过表达增加根瘤数目	<i>Glyma09g02920</i>	编码类Dicer蛋白	Li等2010
miR172	正向调控大豆结瘤数量,增加固氮酶活性	<i>AP2-2</i> (<i>Glyma11g15650</i>)	编码AP2家族转录因子	Yan等2013
miR172c	正向调控根瘤发生和根瘤数量	<i>NNC1</i> (<i>Glyma12g07800</i>)	编码AP2家族转录因子	Wang等2014
miR167c	正向调控结瘤数量	<i>ARF8a</i> (<i>Glyma02g40650</i>); <i>ARF8b</i> (<i>Glyma14g38940</i>)	编码ARF家族转录因子	Wang等2015
miR393j-3p	负向调控大豆结瘤数量	<i>ENOD93</i> (<i>Glyma06g24760</i>)	编码早期结瘤素蛋白ENOD93	Yan等2015
miR2606b	正向调控大豆结瘤数量	<i>Glyma07g02290</i>	编码甘露糖寡糖1,2- α -甘露糖苷酶	Yan等2016
miR4416	负向调控大豆结瘤数量	<i>RIP1</i> (<i>Glyma11g29920</i>)	编码根瘤菌诱导过氧化物酶	Yan等2016
miR393d	负向调控大豆结瘤数量	<i>TIR1A</i> (<i>Glyma.02g152800</i>); <i>TIR1C</i> (<i>Glyma.19g206800</i>); <i>ABF3A</i> (<i>Glyma.19g100200</i>)	编码生长素受体类蛋白	Cai等2017
miR171o	负向调控大豆结瘤数目	<i>SCL6-1</i> (<i>Glyma01g18040</i>)	编码GRAS家族转录因子	Hossain等2019
miR171q	负向调控大豆结瘤数目	<i>NSP2.1</i> (<i>Glyma04g43090</i>)	编码GRAS家族转录因子	Hossain等2019
miR160	过表达抑制根瘤发生	<i>Glyma04g43350</i> ; <i>Glyma10g06080</i> ; <i>Glyma10g35480</i> ; <i>Glyma11g20490</i> ; <i>Glyma12g08110</i> ; <i>Glyma12g29720</i> ; <i>Glyma13g02410</i> ; <i>Gyma13g40030</i> ; <i>Glyma19g36570</i>	编码ARF家族转录因子	Turner等2013

根系结瘤及共生固氮分子机制的研究颇为困难。借助克隆测序及高通量测序的手段,在不同的豆科植物中鉴定到了多个可能参与调控该过程的候选miRNAs。Subramanian等(2008)以根瘤菌侵染后不同时间点的根系作为材料,对其中的miRNA进行了高通量的测序分析。结果发现了多个保守的以及新的miRNAs显著响应根瘤菌侵染,其中miR168和miR172在侵染后早期(1和3 h)表现出显著的上调表达,而miR159和miR393则自3 h受到诱导表达后一直持续到12 h。相反,miR160和miR169则在接菌后3 h表达受到明显抑制。2009年,本实验室以根瘤菌侵染后28 d的大豆叶、根和根瘤组织为材料构建了miRNAs文库,通过克隆测序的手段挖掘到多个具有组织特异性的miRNAs,其中miR172c在成熟根瘤中丰度较高(Wang等2009)。Yan等(2015)以不同发育阶段的大豆根瘤为材料进行高通量测序分析,进一步鉴定到139个可能参与大豆根瘤发育过程的miRNAs。同时借助RNA末端平行分析法(parallel analysis of RNA ends, PARE)在根瘤样品中共鉴定到533个可能的miRNA靶基因,其中包括3个结瘤相关的基因和8个根瘤特异表达基因。当植物响应早期根瘤菌侵染时,根毛的变形、弯曲及最终侵染线的形成对后期根瘤的发生发育具有重要作用。次年,以侵染不同时期的大豆根毛为材料,鉴定到114个miRNAs,其中包括22个新的miRNAs,有48个miRNAs表现出对根瘤菌侵染的显著响应。已有成果为后续对这些miRNAs开展深入功能研究打下了很好的基础(Yan等2016)。

3.2 miR482、miR1512及miR1515具有调控大豆根系结瘤的功能

Li等(2010)借助大豆的毛状根转化体系,成功证明过表达miR482、miR1512及miR1515能够显著增加大豆的根瘤数目,但不影响根长、侧根密度和根瘤原基的数目。同时,通过生信手段预测了这些miRNA的靶基因并进行了表达水平检测,验证到miR482和miR1515的靶基因分别编码GSK-3类蛋白激酶和类Dicer蛋白。另外,该研究也在结瘤因子受体NFR1 α 的突变体及结瘤自调控信号通路中CLE受体GmNARK的超结瘤突变体中对几个候

选miRNAs的表达进行了检测,为后续的机制探索提供了一定的线索(Li等2010)。

3.3 gma-miR2606b和gma-miR4416调控大豆结瘤

Yan等(2016)在响应根瘤菌侵染的miRNA中选择了4个miRNA (TAG_2383310、miR1514、gma-miR2606b、gma-miR4416)开展了功能研究,其中miR1514和gma-miR2606b为豆科特异的miRNA, gma-miR4416、TAG_2383310为大豆特异的miRNA。在大豆毛状根体系中过表达gma-miR2606b使得根瘤数目增加了2.4倍,而gma-miR4416过表达则显著减少了最终的大豆根瘤数目。利用PARE法在相同样品中鉴定,共得到了405个miRNA的候选靶基因,并通过在gma-miR2606b和gma-miR4416过表达的根系中对候选靶基因进行表达水平检测,初步确定gma-miR2606b和gma-miR4416可能分别通过调控甘露糖寡糖1,2- α -甘露糖苷酶(mannosyl-oligosaccharide 1,2- α -mannosidase, MNS)和类根瘤菌诱导过氧化物酶[rhizobium-induced peroxidase 1 (RIP1)-like peroxidase, GmRIP1]的编码基因从而介导大豆的结瘤过程(Yan等2016)。其中MNS基因是否参与豆科植物的结瘤过程尚未见报道,而RIP1在苜蓿中很早就被鉴定属于结瘤素基因,且在根瘤侵染后3 h受到诱导表达(Cook等1995)。相关结果显示GmRIP1和gma-miR4416在根瘤菌侵染早期的根中呈现相反的表达模式,也暗示着gma-miR4416可能通过调控GmRIP1而介导大豆的结瘤和共生固氮过程。

3.4 miR171参与调控大豆的根系结瘤过程

尽管之前已在百脉根和苜蓿中证明miR171通过靶向GRAS转录因子家族的NSP2参与调控根系结瘤及菌根化过程(Hofferek等2014),但其是否参与调控大豆的根瘤发育过程尚未见报道。Hossain等(2019)在大豆中发现miR171家族中的gma-miR171o和gma-miR171q参与调控根瘤的形成。在大豆毛状根中过表达gma-miR171o和gma-miR171q后可显著减少大豆根系结瘤数目。进一步的试验证实gma-miR171o和gma-miR171q可靶向切割编码GRAS转录因子家族的GmSCL-6和GmNSP2的mRNA,从而导致其表达水平的显著下降,并使得大豆根系结瘤数目减少。其中,GmSCL-6在此前并没有被报道

参与调控结瘤过程。该项工作还证实gma-miR171o和gma-miR171q的表达水平改变影响了结瘤信号通路的重要组分NIN、ENOD40和ERN的表达。

3.5 miR393、miR160及miR167通过生长素信号通路的不同组分介导大豆根系结瘤

植物激素生长素已在多个物种中被证明调控组织发生、维管组织分化、植物顶端优势、植物根系的发生、向地性、胚胎及果实发育等方面发挥重要作用(Wang等2011; Jones和Ljung 2012)。miRNA介导的生长素信号通路重要组分在大豆根瘤发生发育过程中的分子调控机制研究也取得了较大进展。

3.5.1 miR160介导靶基因ARF负向调节大豆结瘤数量

miR160的靶基因为生长素信号通路中编码生长素响应因子的ARF基因,在大豆中过表达miR160可增加大豆根系对生长素的超敏感性及对细胞分裂素的不敏感性,并显著减少根瘤发生数目(Turner等2013)。该研究尝试在miR160过表达的根系中检测了既与结瘤相关同时又受到细胞分裂素调控的几个重要的转录因子的表达,其中NIN和NSP1等基因出现了显著的下调表达;同时也检测了生长素信号通路下游的重要组分的表达情况。相关结果暗示着过表达miR160可以显著改变大豆根系对生长素和细胞分裂素的敏感性,从而进一步介导根瘤的发育过程。

3.5.2 miR167通过靶基因ARF8参与大豆结瘤过程

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)等植物中miR167在开花时间及胚胎和种子发育等生物学过程中发挥重要作用(Yao等2019; Arora等2019)。Wang等(2015)发现过表达miR167c可以诱导侧根的发生发育并显著增加根系的结瘤数目,应用了模式植物中报道的短串联靶标技术(short tandem target mimic, STTM)技术下调了miR167c的表达,并发现大豆根系结瘤受到明显抑制;同时还利用5'-RACE技术、转录水平的表达检测及对应的功能验证确定GmARF8a和GmARF8b作为miR167c的靶基因参与大豆的根系结瘤过程。该研究将靶基因识别位点无义突变从而对靶基因的功能进行验证,确定GmARF8a对大豆结瘤

的调控可能只是部分受控于miR167c,其也可能作为独立的功能基因发挥功能。另外,miR167c-GmARF8模块经由经典的NF信号通路参与了低根瘤菌密度条件时的结瘤过程(Wang等2015)。

3.5.3 miR393介导靶基因TIR1参与大豆根瘤发生过程

大豆中编码生长素受体的GmTIR1/AFB3基因的表达模式在大豆根瘤发生发育不同时期具有一定的时空特异性,在大豆的毛状根转化体系中,下调或者过表达miRNA及其靶基因GmTIR1/AFB3时,大豆根瘤的数目也出现了对应的减少或增加(Cai等2017)。miR393通过直接剪切其靶基因GmTIR1C实现对受体基因的负向调控,从而介导大豆响应根瘤菌侵染后的根系结瘤过程;另外,大豆根系细胞对生长素的特异性响应在根瘤的发生发育及最终的根瘤数目决定方面发挥重要作用(Cai等2017)。沉默GmTIR1/AFB3对生长素信号通路中的GmIAA8、GmIAA9、GmIAA14、GmARF8a和GmARF8b的基因表达水平均产生影响(Cai等2017)。与miR167c调控靶基因GmARF8a的机制类似,GmTIR1C过表达也可以在一定程度上促进大豆根系的结瘤,说明其本身也可以作为独立的功能基因发挥作用,同时又在一定条件下受控于miR393。大豆中miR393j-3p可以通过靶向调控结瘤素基因Early Nodulin 93 (ENOD93)而负向调控根瘤的形成过程(Yan等2015),该结果进一步说明了miR393家族调控机制的多样性。

总之,一系列研究结果进一步明确了生长素信号途径中的关键组分受到miRNA的表观遗传调控,更为重要的是,miRNA-靶基因分子模块也参与调控大豆与根瘤菌的互作及根瘤发生发育过程,并且有可能介导成熟根瘤的共生固氮过程。

3.6 miR172调控大豆根系结瘤的分子机制研究

miR172是研究较多的miRNA,已被证明在多个植物生长发育及应答外界环境因子的改变过程中发挥重要调控作用(Zhu和Helliwell 2011; Pan等2016)。尽管miR172在序列上与靶基因的对应序列几乎完全匹配,但其主要通过翻译抑制调控靶基因(Zhu等2009; Mathieu等2009)。但同时也发现,miR172通过降解靶基因从而影响玉米(*Zea mays*)

从营养生长到生殖生长的转换, 或者影响马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 块茎的形成(Lauter等2005; Martin等2009)。

miR172也介导了豆科植物响应根瘤菌侵染及根瘤发生发育甚至共生固氮过程(Subramanian等2008; Lelandais-Brière等2009; Wang等2009; Yan等2013; Nova-Franco等2015)。在大豆中, 尽管利用克隆测序的方法鉴定到miR172c在成熟的大豆根瘤中有较高的富集(Wang等2009), 但直至2013年才通过大豆毛状根转化体系证明miR172j可以正向调控大豆的结瘤数目, 而下调表达其靶基因*AP2-2*也可以得到对应的根瘤数目增加的表型(Yan等2013)。在模式植物拟南芥中已经证明作为miR156靶基因的*SPL*所编码的转录因子可以结合在miR172的启动子上激活其表达, 换言之, miR156可通过*SPL*负调控miR172的表达(Wu等2009)。大豆中过表达miR156o显著减少毛状根根瘤数目, 推测该过程可能是通过调控miR172表达水平而实现的(Yan等2013)。大豆根中miR172j的过表达对共生和非共生豆血红蛋白编码基因的表达也产生影响, 且过表达miR172j的根瘤具有更高的固氮酶活力(Yan等2013)。该工作也通过过表达和RNAi下调表达对预测获得的靶基因*AP2-2*进一步开展了功能分析, 并且确定了其在大豆根系结瘤中的功能(Yan等2013)。Wang等(2014)发现miR172家族的另一成员miR172c通过在转录后水平切割编码*AP2/ERF*家族转录因子的靶基因*NNC1* (*Nodule Number Control 1*; *TOE1*的同源基因)而介导大豆与根瘤菌侵染时的早期根毛变形及根瘤的发生发育过程并影响最终根瘤数量。miR172c对靶基因*NNC1*的调控非常严谨, 只有将miR172c的识别位点进行无义突变以后, *NNC1*才能实现充分的过表达并表现出显著抑制大豆根瘤形成的作用(Wang等2014)。NNC1在响应根瘤菌侵染时直接结合在大豆早期结瘤素基因*ENOD40*的启动子上抑制该基因表达, 从而调控大豆对根瘤菌的响应及根瘤形成和发育(Wang等2014)。miR172c-*NNC1*模块经由NFR1 α /5 α 所介导的结瘤因子信号通路发挥作用, 同时又受到了结瘤自调控信号通路的抑制, 这一结果为miR172c-*NNC1*可能是整合NF和AON信号通路

的节点提供了有利的线索(Wang等2014)。miR172c在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)中正向调控菜豆的根瘤数量和固氮活力(Nova-Franco等2015), 进一步说明miR172调控豆科植物共生固氮的功能具有保守性。

4 展望

豆科植物的根系结瘤及共生固氮过程是一个涉及两种生物识别互动并建立良好共生关系的复杂生物学过程。尽管目前鉴定到由多个组分构成的NF信号通路与结瘤自调控通路参与调控豆科植物的根系结瘤过程, 但这也仅仅是我们全面了解豆科植物SNF过程的冰山一角, 仅就这两个信号通路而言, 其中还存在很多的未知组分, 同时也需要解答其他更多的信号通路是否也参与调控该过程, 多个信号通路是否可能组成更为复杂的分子网络调控大豆的根系结瘤及SNF过程。总之, 还有许多关键科学问题有待我们去回答。问题的解决还需要借助更多样的技术手段和创新性的研究策略, 以期挖掘内在更为复杂的分子调控网络。而作为重要粮油经济作物的大豆, 其根系的正常且稳定结瘤与成熟根瘤SNF效率保持和维持则具有更为重要的研究意义和潜在的应用价值。

自2009年以来对大豆根系的结瘤及根瘤发生发育的分子调控开展了一定的研究, 特别是在miRNA通过表观遗传学机制调控大豆响应根瘤菌侵染及后续根瘤发生发育的分子机制方面(Turner等2013; Yan等2013, 2015, 2016; Wang等2014, 2015; Cai等2017), 进一步揭示了由miRNA所介导的表观遗传学调控在大豆-根瘤菌菌植互动、根瘤发生发育及共生中的重要作用, 也为解析大豆结瘤因子信号通路与结瘤自调控信号途径互动维持最适根瘤数量和固氮效率的遗传机理提供了重要证据。然而, 作为富含高蛋白的粮油经济作物, 大豆在进化以及生长发育过程中均与豆科模式植物苜蓿和百脉根有很大的不同, 再加上其基因组的复杂性, 更加暗示着其根瘤形成及共生固氮的分子机制更为复杂, 解析其分子调控网络的难度也更具挑战性。

在分子网络的解析中, 由miRNA-靶基因分子模块所介导的大豆菌植互动及根瘤形成和共生固

氮过程的分子机理可谓是非常重要的一环,但目前还存在很多亟待回答的问题,亟需借助更多分析策略和技术手段站在更高更广的维度来解析其分子调控网络。例如,当miRNA的靶基因编码转录因子时,可在研究其分子模块的调控功能之后,利用ChIP-seq对其下游靶基因进行高通量的分析并通过后续的实验验证其在大豆结瘤及共生固氮中的功能。另外,还可以借助IP-MS技术对靶基因编码蛋白在大豆根系结瘤及共生固氮过程中的潜在候选互作蛋白开展大规模的筛查,并对互作蛋白的生物学功能进行研究,从而建立大豆根系结瘤及共生固氮的分子调控网络。相关结果可以进一步丰富在大豆根系结瘤及共生固氮的生物学过程中miRNA-靶基因分子模块所介导的分子调控网络。

参考文献(References)

- Arora S, Pandey DK, Chaudhary B (2019). Target-mimicry based diminution of miRNA167 reinforced flowering-time phenotypes in tobacco *via* spatial-transcriptional biases of flowering-associated miRNA. *Gene*, 682: 67–80
- Arrighi JF, Barre A, Ben Amor B, et al (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol*, 142: 265–279
- Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, et al (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J*, 54: 876–887
- Cai Z, Wang Y, Zhu L, et al (2017). GmTIR1/GmAFB3 - based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation. *New Phytol*, 215: 672–686
- Charpentier M, Sun J, Vas Martins T, et al (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352: 1102–1105
- Combiér JP, Frugier F, de Billy F, et al (2006). *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev*, 20: 3084–3088
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, et al (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 7: 43–55
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, et al (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417: 962–966
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, et al (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol*, 52: 61–76
- Groth M, Takeda N, Perry J, et al (2010). NENA, a *Lotus japonicus* homolog of *Sec13*, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell*, 22: 2509–2526
- Hofferek V, Mendrinna A, Gaude N, et al (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target *NSP2* a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol*, 14: 199
- Hossain MS, Hoang NT, Yan Z, et al (2019). Characterization of the spatial and temporal expression of two soybean miRNAs identifies SCL6 as a novel regulator of soybean nodulation. *Front Plant Sci*, 10: 475
- Indrasumunar A, Kereszt A, Searle I, et al (2010). Inactivation of duplicated *nod factor receptor 5 (NFR5)* genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Physiol*, 51: 201–214
- Indrasumunar, A, Searle I, Lin MH, et al (2011). Nodulation factor receptor kinase 1 α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant J*, 65: 39–50
- Jones B, Ljung K (2012). Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Curr Opin Plant Biol*, 15: 97–102
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, et al (2005). *MicroRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 9412–9417
- Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, et al (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell*, 21: 2780–2796
- Li H, Deng Y, Wu T, et al (2010). Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiol*, 153: 1759–1770
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, et al (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425: 637–640
- Martin A, Adam H, Díaz-Mendoza M, et al (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development*, 136: 2873–2881
- Mathieu J, Yant LJ, Mürdter F, et al (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol*, 7: e1000148
- Nova-Franco B, Íñiguez LP, Valdés-López O, et al (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-*Rhizobium etli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol*, 168: 273–299
- Pan WJ, Tao JJ, Cheng T, et al (2016). Soybean *miR172a* improves salt tolerance and can function as a long distance

- signal. *Mol Plant*, 9: 1337–1340
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, et al (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425: 585–592
- Rogers K, Chen X (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 25: 2383–2399
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, et al (2008). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics*, 9: 160
- Tsikou D, Yan Z, Holt DB, et al (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 362: 233–236
- Turner M, Nizampatnam NR, Baron M, et al (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiol*, 162: 2042–2055
- Wang W, Xu B, Wang H, et al (2011). *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol*, 157: 1805–1819
- Wang Y, Li P, Cao X, et al (2009). Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules. *Biochem Biophys Res Commun*, 378: 799–803
- Wang Y, Li K, Chen L, et al (2015). microRNA167-directed regulation of the auxin response factors *GmARF8a* and *GmARF8b* is required for soybean nodulation and lateral root development. *Plant Physiol*, 168: 984–999
- Wang Y, Wang L, Zou Y, et al (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate *ENOD40* expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, 26: 4728–4801
- Wu G, Park MY, Conway SR, et al (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 138: 750–759
- Yan Z, Hossain MS, Arikat S, et al (2015). Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytol*, 207: 748–759
- Yan Z, Hossain MS, Vakkés-López O, et al (2016). Identification and functional characterization of soybean root hair microRNAs expressed in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Biotechnol J*, 14: 332–341
- Yan Z, Hossain MS, Wang J, et al (2013). miR172 regulates soybean nodulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 26: 1371–1377
- Yao X, Chen J, Zhou J, et al (2019). An essential role for miRNA167 in maternal control of embryonic and seed development. *Plant Physiol*, 180: 453–464
- Zhu QH, Upadhyaya NM, Gubler F, et al (2009). Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol*, 9: 149
- Zhu QH, Helliwell CA (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot*, 62: 487–495

Research progress on miRNA-mediated molecular mechanisms of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in soybean

LI Ke-Xue^{*}, QU De-Jie, HUANG Hui-Mei, CAO Jin-Shan, FAN Zi-Hui, LI Guo-Ji, WANG You-Ning

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Soybean is a globally important grain and oil cash crop, which is rich in protein and oil. Due to the higher requirement for nitrogen during developmental stages, chemical fertilizer is mainly applied for the production of soybean. Except for absorbing nitrogen compounds from soil or fertilizer, soybean has evolved the process of symbiotic nitrogen fixation (SNF) to get some of the nitrogen they need through working with specialized bacteria, which lived in root nodules. SNF has large effects on plant growth, seed yield and quality of soybean. Although it is a better way for soybean getting more nitrogen for itself, providing substantial economic and environmental benefits, the molecular mechanisms underlying SNF remains elusive in soybean. Recently, there has a big progress in the study of the molecular mechanisms underlying SNF of soybean, especially in uncovering the role of miRNA in this process. In this review, we therefore mainly summarized the molecular understanding of miRNA-mediated rhizobia infection and nodulation in soybean, and also provided strategies for deeply deciphering the molecular networks modulated soybean nodulation.

Key words: soybean; nodulation; symbiotic nitrogen fixation; molecular mechanism; miRNA

Received 2019-04-11 Accepted 2019-11-04

This work was supported by the National Transgenic Major Project of China (2018ZX08009-19B) and National Natural Science Foundation of China (31872873).

*Corresponding author (kexuely@mail.hzau.edu.cn).