

## 大豆生长素受体基因家族及组织化学表达模式分析

程春红<sup>1</sup>, 蔡兆明<sup>1,2\*</sup>

(1. 长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆, 408100;

2. 安庆师范大学生命科学学院, 皖西南生物多样性研究与生态保护安徽省重点实验室, 安徽 安庆, 246133)

**摘要:**生长素是调控植物生长的主要激素之一, *TIR1/AFB* 是主要生长素受体基因, 参与生长素信号的响应及传递。本研究分析了大豆中生长素受体 *TIR1/AFB* 基因家族各个成员, 依据拟南芥生长素受体基因序列比对及系统进化分析, 可将大豆生长素受体分为三个聚类, 其中 I 类和 II 类分别作为 *ATTIR1/AFB1* 和 *ATAFB2/AFB3* 的同源蛋白均含有 FBOX 和 LRR (Leucine Rich Repeat) 结构域, III 类作为 *ATAFB4/AFB5* 的同源蛋白仅含 LC (Low complexity) 结构域。基因表达芯片分析结果表明, 部分大豆生长素受体基因在不同组织中具有特异性的表达模式, 预示着这些基因可能参与相关生物学过程的调控。组织化学表达模式检测结果表明, 部分生长素受体在大豆主根及侧根中具有特异表达模式, 预示这些基因可能参与大豆主根生长及侧根发生的调控过程。

**关键词:**大豆; 生长素; *TIR1*; *AFB*; 组织化学表达**中图分类号:** S565.103 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2017)04-0437-010**Analysis of soybean auxin receptor gene family and histochemical expression pattern**CHENG Chun-hong<sup>1</sup>, CAI Zhao-ming<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China;

2. School of Life Sciences, Provincial Key Laboratory of the Biodiversity Study and Ecology Conservation in Southwest Anhui, Anqing Normal University, Anqing 246133, China)

**Abstract:** Auxin is one of the most important hormones regulating plant growth and development, and *TIR1/AFBs* are the main auxin receptors involved in auxin response and auxin signaling pathway. In this study, we analyzed *TIR1/AFB* family members in soybean. According to the phylogenetic analysis of auxin receptors between *Arabidopsis* and soybean, the soybean *TIR1/AFB* genes could be subdivided into three groups: clade I and clade II gene members being orthologs of *ATTIR1/AFB1* and *ATAFB2/AFB3*. All of those proteins contain FBOX and leucine rich repeat domain. The clade III gene members were orthologs of *ATAFB4/AFB5*, containing low complexity structure. The transcriptome data showed that some of soybean auxin receptors performed tissue specific expression patterns, indicating that those genes may function in related development stage. Histochemical staining results showed that some of the soybean auxin receptors expressed specifically in root tips and lateral root primordia, suggesting the important roles of those genes in regulation of soybean main root development and lateral root growth.

**Key words:** soybean; auxin; *TIR1*; *AFB*; histochemical expression

大豆为一年生豆科植物, 具有很高的营养及经济价值, 在日常的生产生活中占有重要地位。发掘调控大豆生长发育的重要基因对培育优质大豆品种, 提高大豆产量具有十分重要的意义。

生长素是一种十分重要的植物激素, 在调控胚

胎及果实发育、组织发生、维管组织分化、植物根系的发生和向地性以及植物顶端优势等方面均发挥重要作用<sup>[1]</sup>。生长素对植物根系, 尤其是对植物主根生长及侧根形成方面具有重要作用。

在植株中, 生长素受体蛋白含有 FBOX 结构域,

收稿日期: 2017-03-01

基金项目: 安庆师范大学科研启动经费项目 (044-150002030)

作者简介: 程春红 (1989-), 女, 黑龙江牡丹江人, 博士, 研究方向为植物生理及分子遗传学, E-mail: xiaobei15109217512@163.com

\* 通讯作者: 蔡兆明 (1984-), 男, 吉林四平人, 讲师, 博士, 主要从事大豆生理及分子遗传学研究, E-mail: caizhaoming-2000@163.com

作为 SCF (Skp - Cullin - F - box) 型泛素 E3 连接酶复合体中的组分发挥功能。TIR1 作为最早发现的生长素受体, 在生长素信号通路中发挥重要作用<sup>[2,3]</sup>。在低浓度生长素的情况下, AUX/IAA 可与 ARF (auxin response factor) 形成二聚体, 抑制 ARF 的转录激活活性, 生长素信号处于关闭状态; 在高浓度生长素的情况下, 生长素分子可与 TIR1 直接结合, 增强 TIR1 与 AUX/IAA 的结合能力, 通过泛素蛋白酶体途径降解 AUX/IAA 蛋白, 释放对 ARF 的抑制作用, 开启生长素信号通路<sup>[4]</sup>。植物中存在与 TIR1 具有类似结构的蛋白 AFB1、AFB2、AFB3、AFB4 及 AFB5, 它们与 TIR1 一样是生长素的受体<sup>[5-7]</sup>。

植物根系局部的生长素梯度及特定部位的生长素积累对于根原基的发生具有至关重要的作用<sup>[8]</sup>。如根毛的发生依赖于生长素内运蛋白 AUX1 (auxin influx transporter 1) 的参与, 而植物根分生组织的活动及根尖的发育则依赖于生长素外运蛋白 PIN 的参与<sup>[9,10]</sup>。在拟南芥中, AUX/IAA 可参与侧根发生数目的调控。IAA14 功能获得突变体 *slr-1* 中, 由于中柱鞘细胞无法分裂, 导致该突变体无法形成侧根原基<sup>[11]</sup>, 而 IAA14 功能缺失突变体 *iaa14-1* 却无异常的侧根发生表型, 说明在拟南芥的 29 个 AUX/IAA 家族中, 除 IAA14 外, 还有其它成员参与侧根发生的调控<sup>[12]</sup>。后续研究表明, IAA14 可与 ARF7 及 ARF19 形成二聚体, 而 *arf7 arf19* 双突变体与 *slr-1* 具有类似的侧根发生表型, 说明 IAA14 很可能通过这两个 ARF 调控侧根发生<sup>[13,14]</sup>。ARF 家族成员既包含转录激活因子, 也包含转录抑制因子。如 *arf10 arf16* 双基因突变体导致侧根发生数目增多; *miR160* 负调控 *ARF10*、*ARF16* 及 *ARF17* 的表达, 过表达 *miR160* 后, 植株也表现侧根增多的表型<sup>[15]</sup>。生长素受体单基因突变体植株 *tir1* 或 *afb* 的侧根发生数目没有明显变化或仅略微减少, 但 *tir1 afb2 afb3* 三基因突变体侧根发生数目与野生型相比则减少 90%, 说明生长素对侧根发生数目具有显著影响<sup>[5,16]</sup>。

自 2005 年, TIR1 被确证为生长素受体以来, 对生长素受体 TIR1/AFB 相关的功能研究在模式植物拟南芥和水稻等作物中取得了较大的进展, 研究发现 TIR1/AFB 在植物生长发育以及响应逆境胁迫等多个生物学过程中均发挥功能。在拟南芥中, TIR1/AFB 可通过参与生长素信号通路影响植株的叶片发生数目及子叶生长的偏上性状<sup>[17]</sup>。而对于地下部分的生长发育, 拟南芥生长素受体 ATAFB3 可特

异地响应硝酸盐信号调控主根长度及侧根发生密度<sup>[18]</sup>。在水稻中, RNAi 敲除 *OsTIR1* 和 *OsAFB2* 后可显著增加旗叶夹角<sup>[19]</sup>, 而 *OsTIR1* 和 *OsAFB2* 被抑制后还会导致水稻植株出现分蘖数增加及早花的表型<sup>[20]</sup>。

在拟南芥中, ABA 处理可抑制植株侧根发生, 而当过表达 AFB2 后, ABA 对侧根生长的抑制解除, 说明 AFB2 在拟南芥参与逆境响应过程中发挥功能<sup>[21]</sup>。TIR1/AFB 在植物响应生物逆境胁迫过程中同样具有重要功能, 在拟南芥中, 采用细菌鞭毛蛋白 Flg22 处理植株后, *TIR1*、*AFB1*、*AFB2* 和 *AFB3* 的基因表达水平下调, 进而降低植物体生长素信号通路的强度, 使植物对外源菌的抗病性增强<sup>[22]</sup>。

大豆中同样存在 TIR1/AFB 生长素受体基因家族成员, 但它们的相关研究仍未见报道。本研究分析了大豆生长素受体 TIR1/AFB 基因家族成员的结构和功能, 并对它们的基因表达模式进行了分析, 期为研究生长素调控大豆生长发育的相关功能提供支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料及培养

实验材料为已完成基因组测序的大豆品种 *Glycine max* var. Williams 82<sup>[23]</sup>。大豆培养条件为: 以蛭石作为培养基质, 温度 26℃, 光培养 16h, 暗培养 8h, 湿度 60%。在大豆材料生长期间, 每 5d 以纯净水浇灌, 保证培养基质的湿度和养分。

### 1.2 拟南芥及大豆生长素受体基因序列获得及系统进化树构建

在拟南芥信息资源网站 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载生长素受体 *TIR1*、*AFB1*、*AFB2*、*AFB3*、*AFB4* 和 *AFB5* 基因序列及蛋白编码序列。以拟南芥生长素受体蛋白编码序列为条件在植物基因组数据库网站 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) 中搜索各基因在大豆中的同源基因, 选取序列同源性高于 60% 的基因作为备选基因, 并获得各个基因的基因全序列及蛋白编码序列。采用生物信息学在线分析软件 Plaza ([http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\\_v3\\_dicots/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_dicots/)) 对大豆中获得的基因进行进化分析, 选择拟南芥生长素受体基因的直系同源基因作为目的基因。采用基因结构在线分析软件 GSDS2.0 (Gene Structure Display Server; <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制基因结构图。采用 MEGA 5.0 软件对各基因蛋白序列进行比对, 选择 Neighbor - Joining 算法

构建系统进化树,bootstrap 值为 1 000<sup>[24]</sup>。

### 1.3 基因蛋白结构域分析

利用蛋白结构域在线分析软件 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对生长素受体蛋白结构域进行预测。采用蛋白结构在线分析软件 ExPASy (Prosite; <http://prosite.expasy.org/prosite.html>)绘制蛋白结构域模式图。

### 1.4 大豆生长素受体基因表达模式分析

在大豆资源在线网站 SoyBase(<https://soybase.org/>)上获取大豆生长发育期生长素受体基因芯片表达数据,在植物生物学生物分析资源网站(The bio - Analytic Resource for Plant Biology; <http://www.bar.utoronto.ca/>)上下载生长素受体在生长发育及根瘤菌侵染状态下基因芯片表达数据。利用 MeV 4.5 软件对得到的基因表达数据进行矩阵分析<sup>[25]</sup>。同时,采用荧光定量 PCR (qRT - PCR)的方法,以大豆品种 Williams 82 不同组织材料 cDNA 为

模板对部分基因的转录表达模式进行验证,实验所用引物见表 1。

### 1.5 启动子 - GUS 组织化学染色载体构建

对 *Glyma. 19G206800* 和 *Glyma. 19G100200* 蛋白编码序列上游启动子顺式作用元件分析结果显示,在 *Glyma. 19G206800* 上游 1 643 bp 及 *Glyma. 19G100200* 上游 1 864 bp 的区段内包含生长素功能相关的顺式作用元件,因此选择相应长度的 DNA 序列作为各自基因启动子。在提取大豆全基因组 DNA 后,分别扩增目的基因启动子序列,PCR 扩增引物见表 1。以 pCAMBIA 1391 为目的载体,选择 *HindIII* 和 *BamHI* 作为酶切位点将目的基因启动子连入载体,构建成功的载体转化进生根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* K599 中用于转基因侵染大豆。依据 Kereszt 等的方法<sup>[26]</sup>,采用大豆发根转化技术,在大豆中表达构建好的两个载体,分析各基因组织化学表达模式。

表 1 引物序列  
Table 1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	用途 Aim	引物 Primer sequence
<i>Glyma. 19G206800</i>	启动子 PCR for promotor	F:CCAAGCTTGGATAGCAGACCTGAAATGT R:CGGGATCCCGTCGCTTAACCAACTCAC
<i>Glyma. 19G100200</i>		F:CCAAGCTTCAAGTCATTGTCTTCCCGT R:CGGGATCCCTCTCACTCAGTGATCCAAAATC
<i>Glyma. 02G065300</i>	qRT - PCR	F:GATGCCAGCCGTTTGATTCGA R:GGTGAAGACTCCATTGGTTGGG
<i>Glyma. 16G146400</i>	qRT - PCR	F:GATGTGTAGATCGTCATTGCTG R:GGTCTTGCCACACAACC
<i>Glyma. 16G050500</i>	qRT - PCR	F:CACTTACCACACCTTCTCC R:GGCACTCACATGTTCCGTGC
<i>Glyma. 19G100200</i>	qRT - PCR	F:GTGTTGTGTTTACCTTACTTGGTTGC R:GTGATAGAAAGCCTCAAAAACC

### 1.6 大豆转基因发根组织化学染色

将转入生长素受体基因启动子 - GUS 的大豆转基因植株于培养室中培养,分别在植株长出主根(培养 14d)和侧根(培养 18d)时对根部进行取材,放入配制好的 GUS 染色液中于 37℃ 黑暗中染色 12h。待染色结束后将 GUS 染色液吸去,加入 75% 酒精进行脱色,将材料置于显微镜(Olympus - SZX7)下进行观察,并拍摄照片。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆生长素受体基因结构及系统进化分析

为获得并分析大豆中生长素受体基因,以拟南芥生长素受体 ATIR1 (AT3G62980)、ATAFB1 (AT4G03190)、ATAFB2 (AT3G26810)、ATAFB3 (AT1G12820)、ATAFB4 (AT4G24390) 和 ATAFB5 (AT5G49980) 蛋白编码序列为标准序列,通过序列

同源比对及基因进化直系同源分析共得到 12 个大豆生长素受体基因。采用 MEGA 5 软件对获得的生长素受体基因及拟南芥生长素受体基因进行了系统进化分析。结果显示,获得的 12 个大豆生长素受体基因可分为三个分支:第 I 个分支包含拟南芥 *ATIR1* 和 *ATAFB1* 与 4 个大豆生长素受体基因,分别为 *Glyma. 02G152800*、*Glyma. 10G021500*、*Glyma. 03G209400* 和 *Glyma. 19G206800*;第 II 个分支包含拟南芥 *ATAFB2* 和 *ATAFB3* 与 4 个大豆生长素受体基因,分别为 *Glyma. 02G065300*、*Glyma. 16G146400*、*Glyma. 16G050500* 和 *Glyma. 19G100200*;第 III 个分支包含拟南芥 *ATAFB4* 和 *ATAFB5* 与 4 个大豆生长素受体基因,分别为 *Glyma. 02G211800*、*Glyma. 14G179500*、*Glyma. 04G093500* 和 *Glyma. 06G095400* (图 1)。大豆 12 个生长素受体基因组 DNA 长度在 2 955 bp 至 3 839 bp 之间,它们有相似的基因结构,

均含有 3 个外显子和 2 个内含子。以上结果说明大豆生长素受体基因在进化上较为保守,具有类似的

基因结构及组成。

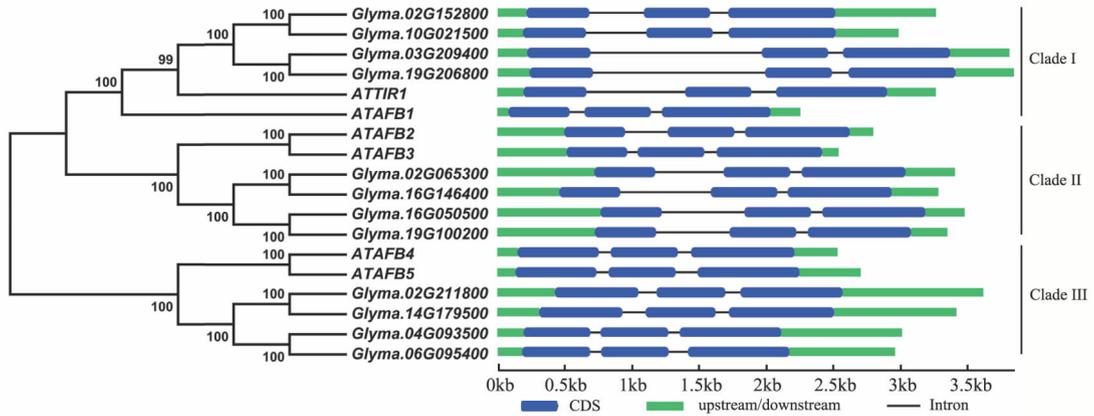


图 1 拟南芥与大豆生长素受体基因结构及系统进化树

Fig. 1 Gene structures and phylogenetic tree of auxin receptors in *Arabidopsis* and soybean

## 2.2 大豆生长素受体蛋白结构域分析

为预测大豆生长素受体的相关功能,利用蛋白结构域在线分析软件 SMART 对拟南芥及大豆生长素受体蛋白保守结构域进行了分析。结果表明在系统进化树第 I 分支中的 4 个大豆生长素受体与它们的直系同源基因一样,含有 FBOX 结构域和 LRR 结构域。其中 ATTIR1 和 ATAFB1 蛋白均含有 6 个串联 LRR 结构域,而 Glyma. 02G152800 和 Glyma. 10G021500 具有相似的蛋白结构,均含有 4 个 LRR 串联结构域及一个 LC(low complexity)区域;Glyma. 03G209400 和 Glyma. 19G206800 具有类似的蛋白结构,均含有 7 个 LRR 串联结构域(图 2)。在系统进化树第 II 分支的 2 个拟南芥生长素受体分别为 ATAFB2 和 ATAFB3,蛋白结构域分析结果表明,ATAFB2 作为主要的生长素受体同时含有 FBOX 结构域和 LRR 结构域,而 ATAFB3 仅含有 FBOX 结构域,并未发现含有 LRR 结构。与它们处于同一分支中的 4 个大豆生长素受体均与 ATAFB2 类似,同时含有 FBOX 结构域和 LRR 结构域,其中 Glyma. 02G065300、Glyma. 16G050500 和 Glyma. 19G100200 蛋白结构更为类似,均含有 6 个 LRR 串联结构域,而 Glyma. 16G146400 含有 5 个 LRR 串联结构域(图 2)。在系统进化树第 III 分支的 2 个拟南芥受体 ATAFB4 和 ATAFB5 均不含有 FBOX 结构域,其中 ATAFB4 仅含 1 个 LC 区域,ATAFB5 含有一个 LC 区域和 5 个 LRR 串联结构域。在第 III 分支中的大豆生长素受体与 ATAFB4 具有更为类似的蛋白结构,均不含有 FBOX 结构域和 LRR 结构域,仅含有 1 个或多个 LC 区域。蛋白结构域分析结果表明,与系统进化树一致,处于同一分支中的拟南芥与大豆

生长素受体具有更为类似的蛋白结构(图 2)。第 I 分支与第 II 分支中的大豆生长素受体同时含有 FBOX 结构域和 LRR 串联重复结构域,推测它们与 ATIR1 和 ATAFB2 一样,在大豆中作为主要的生长素受体发挥功能。

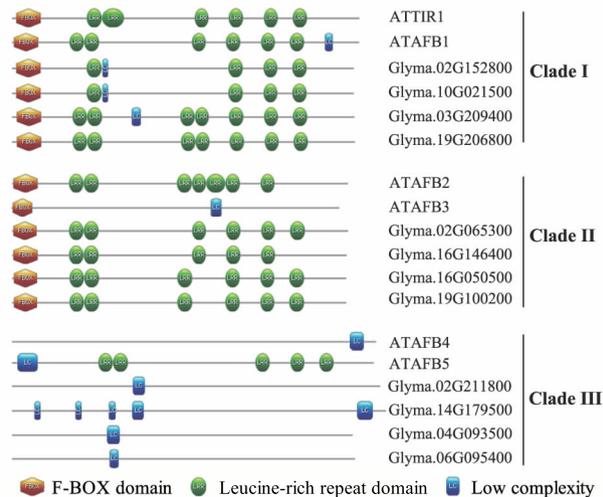


图 2 拟南芥与大豆生长素受体蛋白结构域预测

Fig. 2 Amino acid motif analysis of auxin receptors in *Arabidopsis* and soybean

## 2.3 大豆不同生育期生长素受体基因表达模式分析

为预测大豆生长素受体家族各成员在大豆不同生育期可能发挥的功能,依据 Soybase 数据库中的生长素受体基因表达芯片的结果对各基因成员的组织表达模式进行了分析。结果表明第 I 分支的 4 个生长素受体的基因表达水平比较类似,除个别基因外,总体上具有相似的基因表达模式,说明第 I 分支中的 4 个成员在大豆生长发育过程中可能发挥类似的功能(图 3)。根据基因表达模式分析,与第 I 分支类似,第 III 分支基因成员间也可能存在功能冗余

(图3)。与上述结果不同,第II分支的4个大豆生长素受体基因组织表达强度差异十分明显, *Glyma.02G065300* 和 *Glyma.16G146400* 在各组织中表达水平很低,与之相反, *Glyma.16G050500* 和 *Glyma.19G100200* 在各组织中均有高的表达水平,说明这两个基因很可能调控大豆生长发育的各个过程(图3)。

在大豆的叶组织中,处于第I分支的3个生长素受体基因 *Glyma.10G021500*、*Glyma.03G209400* 和 *Glyma.19G206800* 具有较高的表达水平,说明这3个基因在叶的发育及功能中可能发挥特异的调控作用。尽管 *Glyma.16G050500* 和 *Glyma.19G100200* 在叶中也具有较高的基因表达水平,但由于这两个基因在其它组织中也具有高表达,因此这两个基因在叶的发育及功能的调控方面并不特异(图3)。处于第III分支的 *Glyma.04G093500* 与其它基因相比在花中具有较高的表达水平,说明该基因很可能特异地在花组织中发挥调控功能(图3)。根据第I分支中 *Glyma.02G152800* 和 *Glyma.10G021500* 以及第III分支中 *Glyma.14G179500* 在开花后25~35d种子中特异的高表达水平推测,在大豆种子发育成熟后期,可能主要受到这3个基因的调控;而 *Glyma.06G095400* 在开花后14d种子中特异的高表达水平预示着该基因可能参与大豆种子早期的发育过程(图3)。

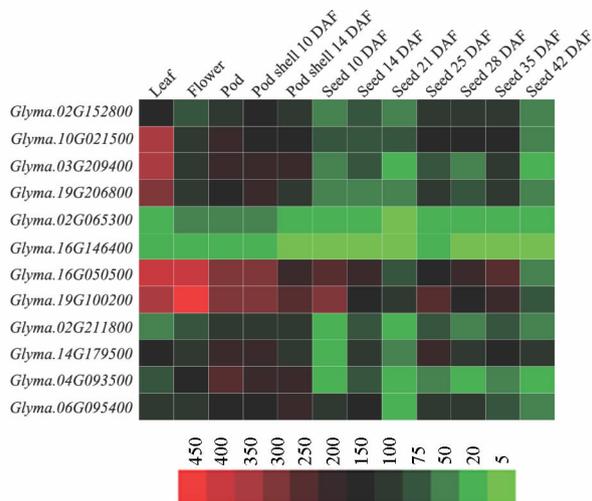


图3 大豆不同生育期生长素受体基因表达模式分析  
Fig.3 Expression pattern analysis of auxin receptor genes in soybean growth and development stages

## 2.4 大豆生长素受体基因在根中及根瘤菌处理条件下组织表达模式分析

为预测大豆生长素受体对植株地下部分生长发育的作用,提取了eFP数据库网站中大豆生长素受体的基因表达芯片结果,并对其进行分析。分析结

果表明,在大豆植株地下部分,第I分支和第III分支的大豆生长素受体基因表达维持在中等强度表达水平,第II分支的生长素受体中,依旧是 *Glyma.02G065300* 和 *Glyma.16G146400* 在各组织中基因表达水平很低,而 *Glyma.16G050500* 和 *Glyma.19G100200* 在各组织中的基因表达水平很高。该结果表明,生长素受体各基因在地上部分和地下部分基因表达水平比较一致,同时也侧面反映出两个数据库基因芯片检测结果较为一致(图4)。

生长素在细胞分裂及细胞伸长过程中发挥重要作用,而细胞分裂及生长主要发生在顶端分生组织及其邻近部位,主要包括茎顶端分生组织(SAM: shoot meristem)和根尖,因此了解生长素在这些组织中的基因表达情况对预测其功能十分重要。因此,首先分析了各生长素受体基因在茎顶端分生组织中的表达。结果表明,3个分支中均有在SAM中特异高表达的基因,即第I分支中的 *Glyma.19G206800*、第II分支中的 *Glyma.16G050500* 以及第III分支中的 *Glyma.04G093500*(图4)。该结果说明这3个基因很可能参与典型的生长素信号通路,调控分生区细胞活动相关的生长发育过程。

对大豆生长素受体在地下组织中的基因表达模式分析结果表明,在根中,第II分支的 *Glyma.16G050500* 和 *Glyma.19G100200* 以及第III分支的 *Glyma.02G211800* 基因表达水平较高,说明这些基因可能参与了大豆根系形态建成方面的相关过程。其中, *Glyma.02G211800* 在根尖组织中表达水平最高,说明该基因与大豆植株根尖分生区细胞的分裂和生长密切相关(图4)。

根瘤是豆科植物与土壤中一类特异的根瘤菌通过共生作用形成的特有组织,可将空气中无机氮气转换成可被植物利用的氨,供植物体生长发育的需要。生长素信号通路与根瘤的发生发育密切相关,因此对生长素受体在根瘤中的表达模式进行分析十分必要。分析结果表明,在12个大豆生长素受体中,第III分支的 *Glyma.04G093500* 在根瘤中的表达水平最高,同时该基因在地下部分所有组织中仅在根瘤中表达水平最高,说明该基因可能与根瘤的生长发育或共生固氮过程密切相关(图4)。根瘤形成早期会发生根瘤菌与植物根毛细胞的相互作用,因此对生长素受体基因在根瘤菌侵染大豆根系早期的基因表达水平进行了分析。结果表明,根瘤菌侵染12h,第I分支的 *Glyma.02G152800*、第II分支的 *Glyma.02G065300*、第III分支的 *Glyma.02G211800* 和 *Glyma.04G093500* 受根瘤菌侵染的诱导表达;根

瘤菌侵染 24h, 第 I 分支的 *Glyma. 02G152800*、*Glyma. 10G021500* 和 *Glyma. 19G206800* 以及第 III 分支的 *Glyma. 02G211800* 受根瘤菌侵染的诱导表达; 根瘤菌侵染 48h, 第 I 分支的 *Glyma. 10G021500* 受根瘤菌侵染的诱导表达。其中, *Glyma. 02G211800* 在根瘤菌侵染 12h 和 24h 后, 基因表达水平提高十分明显, 说明该基因可能在植物根系响应根瘤菌侵染过程中发挥重要功能(图 4)。

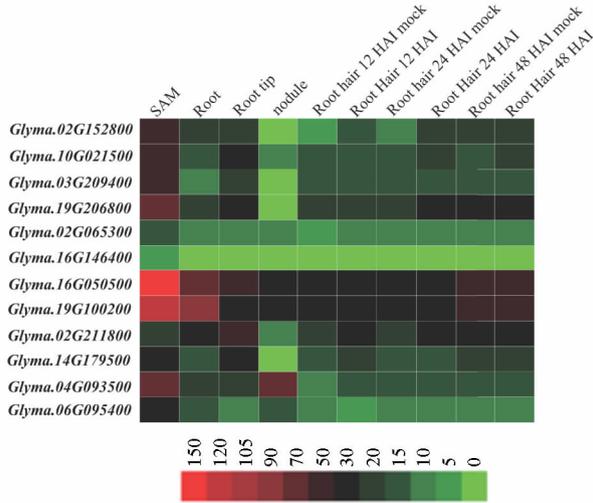


图 4 大豆根中生长素受体基因表达模式及根瘤菌侵染条件下基因表达模式分析

Fig. 4 Expression pattern analysis of auxin receptor genes in root and under Rhizobia treatment

## 2.5 第 II 分支各基因在大豆不同组织中转录水平检测

以第 II 分支的四个基因为对象, 采用 qRT-PCR 的方法, 对大豆生长素受体部分基因在大豆不同组织中的转录水平进行检测。研究表明 *Glyma. 02G065300* 和 *Glyma. 16G146400* 在检测的所有组织中基因表达水平较低, 而 *Glyma. 16G050500* 和 *Glyma. 19G100200* 在各组织中的基因表达水平相对较高, 该结果与基因芯片检测的数据结果基本一致(图 5)。所有基因在不同组织中的表达水平具有相似特点, 它们均在根瘤中的表达水平最高, 在花中表达水平也相对较高, 而在根、茎、叶中的表达水平则相对较低(图 5)。这一结果说明, 生长素受体在大豆根瘤及花发育过程中需要维持高表达水平来调节相应的发育过程。由于取样材料限制, 并未对根部的根毛及根尖进行取样, 基于第 II 分支各基因在根中表达水平较低, 而基因芯片结果显示各基因在分生组织、根尖及根毛中表达水平较高的检测结果表明, 在调控大豆根系形态建成方面需要生长素受体在特定的部位发挥功能而并不需要组成型的持续表达。

由于 ATTIR1 和 ATAFB2 是拟南芥中主要的生长素受体, 且它们在大豆中的同源基因均含有 FBOX 结构域和 LRR 结构域, 选择第 I 分支中 ATTIR1 的同源基因 *Glyma. 19G206800* 和第 II 分支中 ATAFB2 的同源基因 *Glyma. 19G100200* 构建启动子-GUS 表达载体, 通过组织化学染色的方法, 分析它们在大豆中的基因组织表达模式。

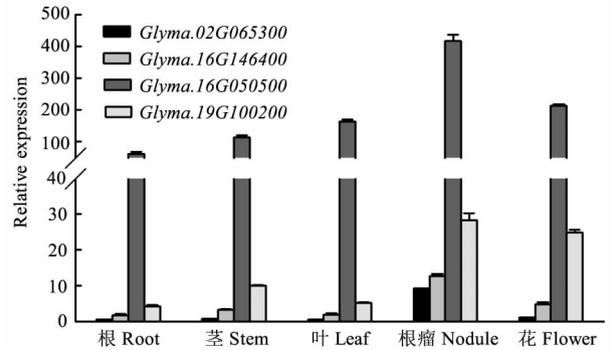


图 5 第 II 分支基因在大豆不同组织中转录表达水平分析  
Fig. 5 Gene transcript expression level test in calde II

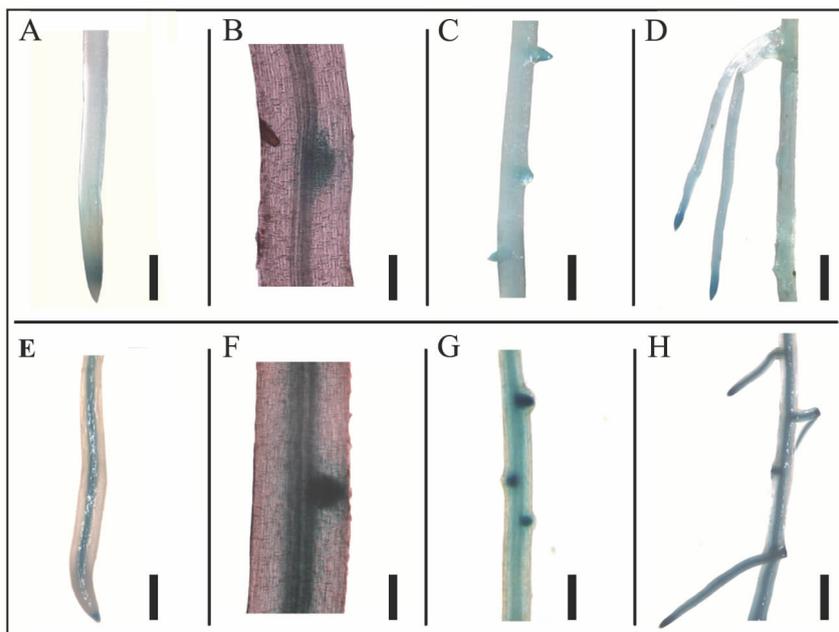
## 2.6 Glyma. 19G206800 和 Glyma. 19G100200 组织化学表达模式分析

研究结果表明, 在 *Glyma. 19G206800pro::GUS* 转基因大豆植株的主根中, 染色部位特异地分布在主根的分生区(图 6A), 说明该基因对调控根尖分生区细胞的分裂及生长具有重要作用, 因此推测该基因与大豆主根生长密切相关。在侧根发生阶段, 该基因则仅在中柱部位的侧根原基中表达(图 6B)。随着侧根的发育, 在产生幼嫩侧根时期, 该基因仅在侧根部位表达(图 6C)。在成熟的侧根中, *Glyma. 19G206800* 的表达模式与主根类似, 在侧根根尖部位具有特异的高表达水平(图 6D)。该结果说明, 在大豆主根生长和侧根发生发育过程中, *Glyma. 19G206800* 在细胞分裂活跃的分生区部位维持组织特异性高表达水平, 表明该基因通过调控分生区细胞的活动特异性地影响大豆主根生长和侧根发生发育。

对 *Glyma. 19G100200pro::GUS* 转基因大豆根中的组织化学染色结果表明, *Glyma. 19G100200* 特异地在主根中柱及根尖部位表达, 但与 *Glyma. 19G206800* 的表达模式相反, 该基因在主根根尖分生区部位却表现为不连续的表达(图 6E)。 *Glyma. 19G100200* 在中柱部位的表达预示着该基因可能参与根木质部相关的水分和矿物质运输过程及韧皮部相关的养分运输过程, 而该基因在根尖部分的表达预示着该基因可能也参与大豆主根生长及发育过程, 且在功能上与 *Glyma. 19G206800* 相互补充。在

侧根原基形成阶段, *Glyma. 19G100200* 在中柱及侧根原基中具有组织特异的表达模式(图 6F), 随着侧根的发育, 该基因在侧根原基中具有高水平的特异表达(图 6G), 说明该基因在大豆侧根发生过程中同样发挥重要调控功能。在成熟侧根中, *Glyma.*

*19G100200* 依旧主要在中柱中表达, 但与主根中的表达模式不同, 该基因在侧根根尖分生区的整个部位均有特异的高表达水平(图 6H), 说明该基因在大豆侧根的生长及发育过程中具有重要的调控作用。



注: A ~ D: 表达 *Glyma. 19G206800pro::GUS* 的转基因大豆根系; E ~ H: 表达 *Glyma. 19G100200pro::GUS* 的转基因大豆根系。A、C、D、E、G、H 的比例尺 = 3mm, B、F 的比例尺 = 1cm。

Note: A - D: Transgenic soybean root expressing *Glyma. 19G206800pro::GUS*; E - H: Transgenic soybean root expressing *Glyma. 19G100200pro::GUS*. A, C, D, E, G, H; bar = 3mm, B and F; bar = 1cm

图 6 *Glyma. 19G206800pro::GUS* 和 *Glyma. 19G100200pro::GUS* 组织化学表达模式分析

Fig. 6 Histochemical staining of soybean transgenic roots expressing *Glyma. 19G206800pro::GUS* and *Glyma. 19G100200pro::GUS*

### 3 讨论

生长素受体是生长素信号通路中最上游的调控因子, 对生长素信号通路的开关十分重要<sup>[27]</sup>。TIR1/AFB 介导的生长素信号通路在植物中的作用十分广泛, 包括植物器官发生<sup>[28]</sup>、叶子发育<sup>[19]</sup>、根系发育<sup>[29]</sup>、生物逆境胁迫响应<sup>[30]</sup>及非生物逆境胁迫响应等诸多过程<sup>[31]</sup>。然而, 大豆生长素受体相关功能的研究却未见报道。因此, 本研究详细分析了大豆生长素受体基因家族的成员及表达模式等特征, 为今后大豆生长素受体功能的研究奠定基础。

根据基因同源序列比对和直系同源分析, 在大豆中共找到 12 个生长素受体基因, 是拟南芥中生长素受体基因的 2 倍。系统发育树和基因结构的分析结果表明, 大豆 12 个生长素受体基因每 2 个形成一个小分支, 且它们互相之间具有十分相近的基因组长度、外显子长度和内含子长度(图 1), 说明在大豆中每一个生长素受体基因都含有两个拷贝。大豆生

长素受体含有多个拷贝的现象可能与大豆的进化相关。尽管大豆被认为是二倍体植物, 但其基因组测序及进化研究结果表明大豆曾经历过两次基因组加倍, 一次发生在早期大豆所在的蝶形花亚科基因组加倍, 一次发生在后期的大豆物种基因组的加倍<sup>[23,32]</sup>, 因此拟南芥的一个生长素受体基因对应大豆中多个生长素受体基因, 与大豆物种进化历史一致。由此可以推测大豆生长素受体不同基因之间, 尤其是处于同一小分支上的两个基因之间可能存在功能上的冗余。

基因芯片表达数据的结果也表明处于同一小分支内部的两个大豆生长素受体基因在基因表达模式上十分相似。如第 II 分支中第一个亚分支上的两个基因 *Glyma. 02G065300* 和 *Glyma. 16G146400* 在各个组织中表达水平都较低, 而第 II 分支中第二个亚分支上的两个基因 *Glyma. 16G050500* 和 *Glyma. 19G100200* 在各个组织中的表达水平都较高(图 3、4)。因此, 大豆生长素受体每个基因对应的两个拷

贝不仅在序列上相近,在表达模式上也十分雷同,由此推测它们在调控植物生长发育过程中基因功能冗余现象十分普遍。生长素受体基因功能冗余现象不仅在大豆中存在,在其它物种中也较为普遍。如在模式植物拟南芥中,对于 *TIR1/AFB* 单基因突变体,仅 *tir1-1* 基因缺失突变体对 2,4-D 处理表现为敏感性降低,而 *tir1-1 afb2* 双基因突变体相比于 *tir1-1* 单基因突变体则表现为对生长素更加不敏感,说明 *AFB2* 作为生长素受体在基因功能上与其它受体存在冗余<sup>[33]</sup>。在水稻中 *OsTIR1* 和 *OsAFB2* 也同时调控水稻对盐胁迫的敏感性<sup>[34]</sup>。因此,在后期研究大豆生长素受体基因功能及大豆育种过程中必须考虑并合理利用基因功能冗余现象,以取得比较理想的成效。

*Glyma. 19G206800pro:GUS* 转基因大豆根系组织化学染色结果表明,该基因在主根、侧根原基以及侧根的分生区具有特异性的表达,该结果与其在拟南芥中的同源基因 *ATTIR1* 的表达模式类似。在拟南芥中,*ATTIR1pro:GUS* 在根系的所有部位呈现组成型表达,但由于上游调控因子 miR393 的转录后抑制作用,*ATTIR1* 在主根及侧根分生区以外部位的转录产物被降解,使其仅在主根及侧根原基的分生区发挥作用,该结果可被 *ATTIR1pro:cTIR1:GUS* 的组织化学染色结果证明<sup>[30]</sup>。相比于拟南芥中的同源基因 *ATTIR1*,*Glyma. 19G206800* 调控大豆主根生长及侧根发生的过程更加简单,仅在发挥功能的部位表达来对根系形态建成进行调控。*Glyma. 19G100200* 的组织化学表达模式与拟南芥中同源基因 *ATAFB2* 也略有不同,*ATAFB2* 与 *ATTIR1* 一样,仅在主根及侧根的分生区中表达<sup>[33]</sup>,而 *Glyma. 19G100200* 除在主根及侧根的分生区中表达外,在中柱部位也有强烈的表达,预示着 *Glyma. 19G100200* 在根中具有更为广泛的调节功能。

已有研究表明,在大豆中过表达 miR393 可降低大豆根系对生长素响应的敏感性。miR393 作为上游的调控因子在转录后水平抑制 *TIR1/AFB* 基因的表达,进而影响生长素受体介导的生长素信号通路调控的生物学过程。该结果表明,过表达 miR393 后,*Glyma. 02G065300* (*Glyma02g07240*)、*Glyma. 16G050500* (*Glyma16g05500*) 和 *Glyma. 19G100200* (*Glyma19g27280*) 三个第 II 分支中的基因表达水平均有不同程度的下调,并导致生长素对大豆侧根发生密度抑制作用降低的表型,说明这些基因在调控大豆侧根发生过程中发挥作用<sup>[35]</sup>。而本研究组织化学染色结果表明 *Glyma. 19G100200* 在侧根原基

强烈表达,可能参与大豆侧根发生过程的调控,与上述研究结果一致。近期研究表明,位于生长素信号通路中生长素受体下游的生长素响应因子 ARF 在大豆根瘤发生过程中也发挥功能。如在大豆中过表达 *GmARF8a* 和 *GmARF8b* 可显著降低大豆根瘤发生数目<sup>[36]</sup>。*GmTIR1/AFB2* 是生长素信号通路中位于 *GmARF* 更上游的调控因子,因此很可能通过调控 *GmARF* 来调节大豆根瘤发生发育过程。本研究发现 *Glyma. 04G093500* 在根瘤组织中表达特别强烈且转录水平受到根瘤菌侵染的诱导表达,因此该基因很可能与 *GmARF8* 位于同一信号通路中共同影响大豆根瘤发生过程,需进一步实验进行验证。

## 4 结论

生物信息学研究结果表明,大豆中含有 12 个生长素受体 *ATIR1/AFB* 的同源基因,它们具有相似的基因结构,可分为三个分支。第 I 分支和第 II 分支分别为 *ATTIR1/AFB1* 和 *ATAFB2/AFB3* 的同源基因,具有经典的 FBOX 结构域和 LRR 结构域,第 III 个分支为 *ATAFB4/AFB5* 的同源基因,仅含 LC 区域。大豆生长素受体在大豆生长生育期不同组织中具有不同的表达模式,不同基因成员可能既存在功能上的冗余,也具有组织特异的基因功能。组织化学染色结果表明,第 I 分支和第 II 分支的两个基因在根中具有典型的生长素受体基因表达模式,预示着它们可能通过在根系分生区的组织特异性表达来调控大豆根系形态建成。

## 参考文献:

- [1] Kepinski S, Leyser O. Plant development: auxin in loops [J]. *Curr Biol*;CB,2005,15:208-210.
- [2] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor [J]. *Nature*,2005,435:441-445.
- [3] Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor [J]. *Nature*,2005,435:446-451.
- [4] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones A M, et al. Auxin action in a cell-free system [J]. *Curr Biol*;CB,2003,15:1418-1422.
- [5] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, et al. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins [J]. *Dev Cell*,2005,9:109-119.
- [6] Hu Z, Keceli M A, Piisila M, et al. F-box protein AFB4 plays a crucial role in plant growth, development and innate immunity [J]. *Cell Res*,2012,22:777-781.

- [7] Prigge M J, Greenham K, Zhang Y, et al. The Arabidopsis auxin receptor F-box proteins AFB4 and AFB5 are required for response to the synthetic auxin picloram [J]. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2016, 6:1 383 – 1 390.
- [8] Benjamins R, Scheres B. Auxin: the looping star in plant development [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59:443 – 465.
- [9] Jones A R, Kramer E M, Knox K, et al. Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11:78 – 84.
- [10] Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development [J]. *CSH Perspec Biol*, 2010, 2: aS001537.
- [11] Fukaki H, Tameda S, Masuda H, et al. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2002, 29:153 – 168.
- [12] Okushima Y, Overvoorde P J, Arima K, et al. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19* [J]. *Plant Cell*, 2009, 17:444 – 463.
- [13] Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, et al. Tissue-specific expression of stabilized *SOLITARY-ROOT/IAA14* alters lateral root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2005, 44:382 – 395.
- [14] Wilmoth J C, Wang S, Tiwari S B, et al. *NPH4/ARF7* and *ARF19* promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation [J]. *Plant J*, 2005, 43:118 – 130.
- [15] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17:2 204 – 2 216.
- [16] Perez-Torres C A, Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, et al. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the *TIR1* auxin receptor [J]. *Plant Cell*, 2008, 20:3 258 – 3 272.
- [17] Si-Ammour A, Windels D, Arn-Boulidoires E, et al. *miR393* and secondary siRNAs regulate expression of the *TIR1/AFB2* auxin receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157:683 – 691.
- [18] Vidal E A, Araus V, Lu C, et al. Nitrate-responsive *miR393/AFB3* regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2010, 107:4 477 – 4 482.
- [19] Bian H, Xie Y, Guo F, et al. Distinctive expression patterns and roles of the *miRNA393/TIR1* homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*) [J]. *New Phytol*, 2012, 196:149 – 161.
- [20] Xia K, Wang R, Ou X, et al. *OsTIR1* and *OsAFB2* downregulation via *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice [J]. *PLoS One*, 2012, 7:e30039.
- [21] Chen H, Li Z, Xiong L. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586:1 742 – 1 747.
- [22] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling [J]. *Science*, 2006, 312:436 – 439.
- [23] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463:178 – 183.
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28:2 731 – 2 739.
- [25] Saeed A I, Bhagabati N K, Braisted J C, et al. TM4 microarray software suite [J]. *Method Enzymol*, 2006, 411:134 – 193.
- [26] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2:948 – 952.
- [27] Peer W A. From perception to attenuation: auxin signaling and responses [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 561 – 568.
- [28] Bohn-Courseau I. Auxin: a major regulator of organogenesis [J]. *CR Biol*, 2010, 333:290 – 296.
- [29] Saini S, Sharma I, Kaur N, et al. Auxin: a master regulator in plant root development [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32:741 – 757.
- [30] Pinweha N, Asvarak T, Viboonjun U, et al. Involvement of *miR160/miR393* and their targets in cassava responses to anthracnose disease [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 174:26 – 35.
- [31] Chen Z, Hu L, Han N, et al. Overexpression of a *miR393*-resistant form of transport inhibitor response protein 1 (*mTIR1*) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and  $\text{Na}^+$  exclusion in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56:73 – 83.
- [32] Young N D, Debelle F, Oldroyd G E, et al. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses [J]. *Nature*, 2011, 480:520 – 524.
- [33] Parry G, Calderon-Villalobos L, Prigge M, et al. Complex regulation of the *TIR1/AFB* family of auxin re-

- ceptors[J]. PNAS,2009,106:22 540 – 22 545.
- [34] Iglesias M J, Terrile M C, Windels D, et al. *MiR393* regulation of auxin signaling and redox – related components during acclimation to salinity in *Arabidopsis* [J]. PLoS One,2014,9:e107678.
- [35] Turner M, Nizampatnam N R, Baron M, et al. Ectopic expression of *miR160* results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean [J]. Plant Physiology, 2013,162(4):2 042 – 2 055.
- [36] Wang Y, Li K, Chen L, et al. *microRNA167* – directed regulation of the auxin response factors, *GmARF8a* and *GmARF8b*, is required for soybean (*Glycine max* L.) nodulation and lateral root development [J]. Plant Physiology,2015,168(3):984 – 999.

(责任编辑:王丽芳)