

大豆在暗诱导下光周期及 衰老相关基因的 差异表达研究

赵琳 著 李文滨 主审

01

中国农业科学技术出版社

大豆在暗诱导下光周期及 衰老相关基因的 差异表达研究

赵琳 著 李文滨 主审

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

大豆在暗诱导下光周期及衰老相关基因的差异表达研究/赵琳著.
—北京: 中国农业科学技术出版社, 2009. 5
ISBN 978-7-80233-869-2

I. 大… II. 赵… III. ①大豆—光诱—光周期—研究②大豆—
衰老—基因—研究 IV. S565.101

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 057600 号

责任编辑 邬震坤
责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82106626 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)
传 真 (010) 82106626
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 新华书店北京发行所
印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司
开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32
印 张 6.25 插页 1
字 数 146 千字
版 次 2009 年 5 月第 1 版 2009 年 5 月第 1 次印刷
定 价 25.00 元

版权所有·翻印必究



前言

Introduction

大豆品种的适应范围较窄，因此需要众多光周期反应各不相同的品种类型，分别适应各种不同的生态条件。为了降低大豆品种的光敏感性，减少育种压力，大豆开花与结实的光周期现象，一直受到植物生理学家、遗传学家和育种工作者的广泛关注和重视。

本研究的目的是利用抑制性消减杂交 (SSH) 技术研究大豆在不同日长条件下、在转录水平上的基因表达差异，了解大豆叶片中短日照诱导上调表达的 ESTs 对光周期和衰老相关等生物体生命活动的调节机制。利用 RACE PCR 克隆技术，试图克隆大豆光敏感性转录因子基因，通过转化短日照烟草进行光周期反应基因功能的验证，分析该类基因在光周期反应中的作用。通过基因的克隆和改造，试图从根本上改变大豆对光的敏感性，为大豆单产提高寻找新的突破口，从根本上扭转我国大豆依赖于进口的被动局面。

“大豆在暗诱导下光周期及衰老相关基因的差

异表达研究”来源于我在攻读博士学位期间的主要研究内容。该书研究结果的取得是与导师李文滨教授的悉心指导和辛勤培养分不开的。从设计中的每一个思路到实验中的每一个环节，从写作初期材料的准备到论文的最后定稿，无时无刻不凝结着导师辛勤的劳动和汗水。导师的深厚理论知识和敏捷的思维，令我非常敬佩；孜孜不倦的探索精神和忘我的工作态度时时刻刻都在感染和激励着我；耐心、平易近人以及他在科研中一丝不苟的态度将使我终生受益。谨借本书出版的机会向导师致以最诚挚的谢意！

本书的出版承蒙“国家自然科学基金（30671318）”、“第四十三批博士后科学基金面上项目（20080430879）”、“哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目（RC2008QN002017）”、“东北农业大学博士启动基金”和“大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金项目（SB08A04）”共同资助，在此表示由衷的感谢。

限于水平有限，疏漏、错误在所难免，诚恳有关专家、同仁和广大读者批评指正。

赵琳

2008年4月于哈尔滨



摘 要 Abstract

黑 龙江省是我国大豆主要生产基地，加入世贸组织后，大豆面临严重的进口压力。主要原因是我国大豆单产低，竞争力不强。大豆属于短日照植物，其生长发育对光周期反应非常敏感，这一特性严重阻碍大豆品种的适应性，是制约大豆单产提高和稳产的关键因素。暗处理相当于短日照，可以缩短大豆的开花和成熟期，其表型之一是加速叶片的衰老。叶细胞的结构、代谢和基因表达都协调的发生变化，细胞器官的组分被依次有序的分解。代谢变化包括合成代谢活性的减弱，如光合作用和蛋白质的合成，以及分解代谢的加速，如核酸降解和蛋白水解。这些对维持植物生长和生殖是非常必要的，基因转录物丰度的巨大变化揭示了从有光合活性的叶片到作为流动营养物来源的衰老器官来维持发育的转变情况。

为了打破大豆种植区域的局限性，本研究在细胞分子水平上从基因差异表达的角度研究短日照光周期诱导开花和衰老过程中基因转录丰度的变化，

克隆与大豆光周期反应及衰老有关的基因,从而探索大豆叶片感受日长变化诱导开花和衰老的复杂机制。虽然植物花器官的分化发生在顶端分生组织,在开花过程中的基因表达也必然在顶端分生组织中有所反映,然而植物感受光的器官是叶片,并利用长距离信号通过韧皮部传导至顶端分生组织(SAM)影响生殖生长,在光周期控制开花过程中也必然牵涉叶片中很多基因的互作。由于黑暗的长度是开花时间的关键决定因素,在光周期控制开花过程中基因可能在夜间表达有差异,所以,以昼夜交替时的大豆的两个样本的叶片为研究目的对象,构建了差异表达的cDNA消减文库,发现与暗诱导相关的差异表达基因,揭示了有关参与机体暗适应下蛋白质的上调表达的信息,为进一步分离暗处理产生差异表达基因奠定了基础。

通过转化短日照烟草,进行光周期反应基因的功能验证,分析该类基因在光周期反应中的作用。同时,研究外源激素的施加对光周期途径相关转录因子基因表达的影响;分析开花诱导中基因组织特性的表达情况。本研究的宗旨是通过基因的克隆和改造,试图从根本上改变大豆对光的敏感性,为大豆高产稳产提高寻找新的突破口,从根本上扭转我国大豆依赖于进口的被动局面。

主要结果如下。

1. 本试验首次应用抑制性消减杂交(SSH)技术以东农L13大豆的短日照(8h光/16h暗)和长日照(16h光/8h暗)两个样本为研究目的对象,构建了含有738个克隆的差异表达的cDNA消减文库,对148个克隆进行测序,在此基础上发现了76个与暗诱导相关的差异表达ESTs(上调至少3倍),根据Blastn和Blastx推测这些ESTs的功能包括参与转录、信号转导和细胞凋亡的调节类蛋白;参与大分子降解的酶类如蛋白和核酸的降解、参与细胞壁修饰的合成代谢、初级代谢以及次级代谢的酶类和解毒与防卫的压力反应的基因。揭示了有关参与机体暗适应下蛋白质的上调表达的信息,为进一步分离短日处理产生差异表达基因奠定了基础。



2. 为了研究 GmRAV 在大豆短日照信号转导中的可能作用, 我们利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从大豆中克隆了编码 GmRAV 的 cDNA 序列。序列分析结果表明, GmRAV 基因编码 351 个氨基酸, 含有 AP2/ERF 和 B3 结构域, GenBank 登陆号为 DQ147914, 其 DNA 序列与辣椒、水稻和拟南芥 RAV 基因高度同源。

3. Real-time RT-PCR 分析在短日照和长日照条件下大豆叶片中 GmRAV 基因 mRNA 转录物的丰度变化, 表明该基因的丰度在短日照 (SD) 时都要显著高于在长日照 (LD) 条件下的丰度。

4. 分析 GmRAV 基因在不同组织中 mRNA 转录物的丰度变化表明, SD 强烈诱导 GmRAV 基因在叶、根和茎中的表达。

5. 构建了植物表达载体 pBI121-GmRAV, 用农杆菌介导法转化烟草过量表达该基因, 获得卡那霉素抗性植株 54 株。PCR 方法鉴定 T₀ 转基因株系, 获得 18 个转基因的 PCR 阳性植株。通过 Northern 分析表明这 4 株转基因烟草中的 GmRAV 基因都转录, 表明它们都已成功转入烟草中, 并正常表达。

6. GmRAV 过量表达的烟草植株与对照相比无论在长日照和短日照下植株都明显矮小, 节间距短, 节数少, 并且在土壤中生长时叶片更深绿, 叶片小, GmRAV 过量表达对茎和叶的发育以及植株的生长有推迟抑制作用。转大豆 GmRAV 基因的烟草植株无论在长日照和短日照条件下均表现出开花延迟的特征, 并且光周期敏感性增强, 非转基因烟草在长日照比短日照条件下开花提前 3 天, 而 GmRAV 过表达的烟草植株在长日照比短日照条件下开花却提前 13 天。

7. GmRAV 是 BR 信号转导途径的抑制因子, GmRAV 基因通过抑制 BR 信号而抑制植物细胞伸长从而抑制生长, 导致转基因植株矮化。

8. GmRAV 是 GA 生长信号转导途径中的促进因子, 是 ABA 和黑暗促进衰老途径中的促进因子。

● 关键词 大豆; 光周期; 暗诱导; 衰老; 基因差异表达; 抑制性消减杂交

目 录

1 引 言	1
1.1 植物开花机理的研究进展	3
1.1.1 植物花芽分化过程的调节机制	4
1.1.2 环境条件对植物成花的调控	6
1.2 大豆光周期现象的研究进展	19
1.2.1 大豆生育期性状的光周期反应特性	19
1.2.2 光周期对大豆农艺性状和籽粒品质的影响	22
1.2.3 大豆中光敏感性 E 等位基因的研究进展	23
1.2.4 大豆开花时间基因图谱的绘制	24
1.3 拟南芥开花诱导的分子生物学研究进展	27
1.3.1 光周期途径	28
1.3.2 春化促进途径	33
1.3.3 自主途径	34
1.3.4 赤霉素途径	35
1.3.5 染色质结构和开花抑制	36

1.3.6	拟南芥开花途径的整合	37
1.3.7	植物中的拟南芥开花途径的基因保守性	39
1.4	植物衰老的研究	44
1.4.1	衰老的生理生化反应特性	44
1.4.2	衰老学说	46
1.4.3	衰老的调控	49
1.5	RAV 转录因子的研究进展	52
1.6	基因差异表达的研究方法	53
1.6.1	基于 cDNA 的 PCR 扩增方法	54
1.6.2	基于差减杂交的克隆方法	56
1.6.3	表达序列标签	61
1.6.4	基因表达系列分析	61
1.6.5	微阵列杂交	62
1.6.6	实时荧光定量 PCR 技术	64
1.7	植物遗传转化	65
1.7.1	植物遗传转化方法	65
1.8	研究目的和意义	69
2	材料和方法	73
2.1	实验材料和试剂	75
2.1.1	植物材料	75



2.1.2	菌种及载体	75
2.1.3	主要试剂	75
2.2	实验方法	76
2.2.1	抑制性消减杂交 (SSH)	76
2.2.2	抑制消减文库的构建	84
2.2.3	反向 Northern blot 斑点杂交筛选消减文库	87
2.2.4	测序及序列同源性检索	89
2.2.5	实时荧光定量 PCR 进一步验证差异表达的 片段	90
2.2.6	RACE 方法克隆大豆 GmRAV 基因	92
2.2.7	Real-time RT-PCR 分析 GmRAV 的表达	96
2.2.8	植物表达载体 pBI121-GmRAV 的构建	97
2.2.9	农杆菌介导法转化烟草叶盘	101
2.2.10	转基因烟草的分子生物学检测	103
2.2.11	转 GmRAV 基因烟草 T ₂ 代功能分析	106
3	结果与分析	109
3.1	抑制性消减杂交 (SSH)	111
3.1.1	大豆总 RNA 的提取	111
3.1.2	SMART 技术合成 cDNA	111
3.1.3	双链 cDNA 的 RsaI 酶切结果	112
3.1.4	正向差减产物的 PCR 扩增结果	113
3.1.5	反向 Northern 斑点杂交筛选结果	114
3.1.6	测序与同源性检索结果	116

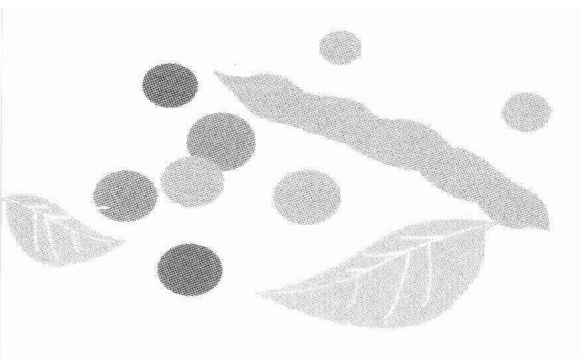
3.1.7	候选 cDNA 片段差异表达检测分析结果	116
3.1.8	基因功能相关分析	117
3.2	大豆 GmRAV 基因克隆	122
3.2.1	大豆 GmRAV 基因 5' RACE 和 3' RACE 克隆	122
3.2.2	大豆 GmRAV 基因全长序列的生物信息学及 系统进化分析	123
3.2.3	GmRAV 全长基因组 DNA 序列的获得	127
3.3	大豆 GmRAV 基因表达研究	128
3.3.1	大豆叶片中 GmRAV 基因在 LD 和 SD 条件下 基因表达	128
3.3.2	大豆 GmRAV 基因在 LD 和 SD 条件下组织特 异性表达分析	128
3.3.3	激素对大豆叶片中 GmRAV 基因的表达影响	130
3.4	植物表达载体 pBI121-GmRAV 的构建	130
3.5	烟草的遗传转化	133
3.5.1	丛生芽和根的诱导	133
3.5.2	转基因烟草的 PCR 检测	133
3.5.3	转基因烟草的 PCR-Southern 检测	134
3.5.4	转基因烟草的 Northern blot 检测	136
3.5.5	长日照和短日照下转基因烟草的 T ₂ 代表型 观察	136
3.5.6	转 GmRAV 基因烟草植株矮化与 BR 和 GA 激素有关	137



3.5.7 过量表达 GmRAV 增强了 ABA 促进叶片衰老的效应	139
3.5.8 暗处理下 GmRAV 过量表达加速植株的衰老	140
4 讨 论	141
4.1 光周期和衰老相关基因表达谱分析	143
4.2 光周期和衰老相关基因的克隆	146
4.3 植物表达载体的构建及烟草的遗传转化	148
4.3.1 采用农杆菌转化植物的优势	149
4.3.2 转化农杆菌及其鉴定	149
4.3.3 用于转化的农杆菌的培养	149
4.3.4 叶盘法转化烟草	150
5 结 论	153
参考文献	158
附 录	176
攻读学位期间发表的学术论文	180
图 版	181



1 引言





1.1 植物开花机理的研究进展

植物的花发育分为开花诱导、花的发端和花器官发育三个阶段。开花是植物在生命周期过程中从营养生长向生殖发育所进行的重要转变,是植物有性生殖的重要一步,所以,植物必须精确地控制开花,才能确保在适当的时间进行有性生殖和种子成熟。生殖生长是高等植物生活史中的重要阶段,而作为执行生殖过程的重要器官——花器官的形成和发育即成花机理更是一直受到生物学家和农学家的关注。

植物在营养生长的基础上、在一定的外界条件诱导下,茎尖分生组织从分化枝叶转为分化生殖器官(花芽),花芽的分化是植物由营养生长转入生殖生长的重要标志。大多数高等植物在其生活周期中均存在一个共同的特点,就是在开花之前要达到一定的年龄或处于一定的生理状态,然后才能具有接受外界环境诱导而开花的能力。植物在感受外界刺激而开花之前必须达到的生理状态称为花熟状态。植物在达到花熟状态之前的营养生长阶段称为幼年期(juvenile phase)。处于幼年期的植物即使满足了其开花所需的外界条件也不能开花。已经达到花熟状态的植物,也只有适宜的外界条件下才能开花。也就是说当植物已达花熟状态时,外界环境的某些因素对植物的开花起主导作用。植物总是在合适的季节才能开花,而季节的变化主要与温度和日照长度的变化有关。研究证明,植物的开花与温度高低和日照长短有密切的关系。因此,花熟状态、温度

(主要是低温) 和光周期是控制植物开花的重要因素。除此之外, 营养以及其他条件与开花也有较为密切的关系。

1.1.1 植物花芽分化过程的调节机制

花芽分化是在分生组织感受成花刺激后发生的一系列生理与形态结构的变化。很早以来人们就对成花的机制问题作了不少研究, 从不同角度和水平上提出了看法。

1.1.1.1 C/ N 比理论

一百年前, 人们就已指出碳水化合物对花芽形成的重要性, 它既是植物体内各种化学物质的碳架提供者, 又是物质所需能量的携带者, 所以, 在花芽分化前首先看到碳水化合物的积累 (钟晓红等, 1999)。20 世纪初, Kreh Hans 提出开花的碳氮比理论认为, 植物体内含氮化合物与同化糖类含量的比例是决定花芽分化主要关键。当 C 占优势时, 开花结实受到促进, N 占优势时, 营养生长受到促进。果树上常常应用移植或修剪树根的办法阻止氮素营养吸收或采用环割树干等办法使 C/ N 增加, 从而达到促进开花结实的目的。但高含量的碳水化合物未必导致成花。Phillips 的研究表明, 高的糖和淀粉含量并不引起苹果形成花芽; 成花难的日本梨品种的糖和淀粉的含量比成花容易的品种高。因此, 高含量的碳水化合物不是成花的唯一决定因子, 还受其他因子的影响。C/ N 学说还没有触及到成花的实质。

1.1.1.2 花诱导理论

植物进行低温春化或光周期诱导成花的事实使人们推测有