

盐穗木miR397a增强转基因拟南芥的低温耐性*

魏冉, 张慧珍, 陈方圆, 赵丽娟, 李文辉, 曾幼玲[†]

(新疆大学 生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要: 盐穗木 (*Halostachys caspica*) 是耐盐性极强的苋科藜属盐生植物. miRNA是长度为21~24 nt的内源性非编码小RNA, 通常在转录后水平负调控靶基因的表达介导多种生物学过程. 从盐穗木高盐胁迫下根的小RNA文库和转录组数据中, 克隆盐穗木miR397a (HcmiR397a) 前体序列和漆酶*HcLACs* (*Laccase*, *LAC*) 为预测的靶基因. 通过实验的方法鉴定HcmiR397a与*HcLACs*的靶向关系及HcmiR397a在多种非生物胁迫下的表达和HcmiR397a的转基因拟南芥在低温胁迫下的功能. 研究表明:(1) 烟草瞬时表达体系和5'RLM-RACE技术确定HcmiR397a与*HcLAC17*之间存在靶向切割, 具体的切割位点位于HcmiR397a的第10~11碱基处;(2) qRT-PCR检测的结果显示盐、干旱和低温胁迫下, 盐穗木同化枝HcmiR397a受到显著诱导;(3) 异源表达HcmiR397a的转基因拟南芥表现出较强的低温耐性.

关键词: 盐穗木miR397a (HcmiR397a); 转基因拟南芥; 低温耐性

DOI: 10.13568/j.cnki.651094.651316.2022.03.05.0001

中图分类号: Q946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2023)01-0087-08

引文格式: 魏冉, 张慧珍, 陈方圆, 赵丽娟, 李文辉, 曾幼玲. 盐穗木miR397a增强转基因拟南芥的低温耐性[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2023, 40(1): 87-94.

英文引文格式: WEI Ran, ZHANG Huizhen, CHEN Fangyuan, ZHAO Lijuan, LI Wenhui, ZENG Youling. *Halostachys caspica* miR397a enhances cold tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2023, 40(1): 87-94.

Halostachys caspica miR397a Enhances Cold Tolerance of Transgenic *Arabidopsis thaliana*

WEI Ran, ZHANG Huizhen, CHEN Fangyuan, ZHAO Lijuan, LI Wenhui, ZENG Youling

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830017, China)

Abstract: *Halostachys caspica* is a halophyte belonging to *Chenopodium* of Amaranthaceae with extreme salt tolerance. miRNA is an endogenous small non-coding RNA with a length of 21~24 nt and participates in a variety of biological processes by negative regulating the expression of target genes at the post transcriptional level. The miR397a precursor were screened, cloned and *LAC* genes(*Laccase*, *LAC*) were predicted from the *H. caspica* root small RNA libraries under high salinity and this species's transcriptome data. This paper aims to identify the targeting relationship between HcmiR397a and *HcLACs* by experimental methods, the expression of HcmiR397a in the *H. caspica* branches under various abiotic stresses and the function of HcmiR397a transgenic *Arabidopsis* under low temperature stress. The results were as follows: (1) Tobacco transient expression system and 5'RLM-RACE technology confirmed that there was a targeted cleavage between HcmiR397a and *HcLAC17*, and the specific cleavage site was located at the 10th~11th base of HcmiR397a; (2) The results of qRT-PCR showed that HcmiR397a was significantly induced under salt, drought and low temperature stress; (3) Transgenic *Arabidopsis* heterologously expressing HcmiR397a improved cold tolerance, compared to the wild type.

Key words: *Halostachys caspica* miR397a(HcmiR397a); transgenic *Arabidopsis*; resistance to low temperature

* 收稿日期: 2022-03-05

基金项目: 国家自然科学基金“荒漠盐生植物盐穗木两个microRNA与靶标基因的耐盐抗旱功能研究”(31760071).

作者简介: 魏冉(1997-), 女, 硕士生, 从事植物的逆境生理和分子机制研究, E-mail: 1084314350@qq.com.

[†] 通讯作者: 曾幼玲(1971-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事植物的逆境生理和分子机制研究, E-mail: zeng_ylxju@126.com.

0 引言

miRNA是真核生物中普遍存在的一类非编码小分子RNA,长度为21~24 nt,通过转录后水平降解或抑制靶基因表达或翻译,在生物的生长发育和胁迫响应方面发挥重要的作用^[1]. 鉴定miRNA与靶基因的靶向关系常常通过以下方法:(1)采用生物信息学方法预测靶基因;(2)qRT-PCR(实时荧光定量PCR)技术检测二者的表达是否存在负相关性^[2];(3)利用烟草瞬时表达体系,检测*GUS*(葡萄糖醛酸酶)报告基因的表达鉴定其靶向性^[3];(4)使用5'RLM-RACE或3'PPM-RACE(RNA连接酶介导的cDNA末端快速扩增)技术确定miRNA对预测靶基因的精确切割位点^[4].

miR397是植物保守的miRNA之一,不同物种的miR397家族大多由1~3个成员组成,已鉴定miR397的靶基因漆酶(*LACs*)属于铜蓝氧化酶蛋白家族^[5]. 5'RLM-RACE技术确定拟南芥*LAC2*、*LAC4*和*LAC17*是miR397的靶基因^[6]. *LACs*家族成员可以将单木醇聚合生成木质素,木质素在维持植物机械韧性和抗倒伏方面发挥作用^[7]. 在大桉(*Eucalyptus grandis*)中,17个*LAC*基因被预测为miR397的靶基因,其中*LACs*基因在木质部中高表达,提高了木质素的生物合成,增强茎的机械韧性^[8].

miR397广泛参与植物的非生物胁迫响应. 干旱胁迫下,拟南芥^[9]和甘蔗(*Saccharum officinarum*)^[10]中miR397的表达被显著诱导. 过表达番茄(*Solanum lycopersicum*)miR397增强转基因拟南芥的干旱抗性^[11]. 异源表达狗尾草(*Setaria viridis*)miR397的拟南芥能够抑制*LAC4*和*LAC17*的表达,导致木质素减少,细胞壁变薄,增加拟南芥对盐胁迫的敏感性^[12]. 低温胁迫下,过表达AtmiR397a的拟南芥上调冷响应基因*CBF2*和*COR*的表达,增强植物对冷胁迫的耐受性^[13]. miR397a成熟体序列在不同植物中保守性较强,但是非生物抗性有所差异,因此,鉴定HcmiR397a在低温胁迫下的功能是必要的.

盐穗木是耐盐性极强的苋科(Amaranthaceae)藜属(*Chenopodium*)盐生植物^[14],生长于中亚盐碱荒漠干旱地区. 本文在高盐胁迫下盐穗木根的小RNA文库中将miR397a作为候选基因^[15],从该物种的转录组数据中预测的靶基因为Hc*LACs*. 克隆得到HcmiR397a前体序列;烟草瞬时表达体系和5'RLM-RACE实验鉴定HcmiR397a和Hc*LAC17*之间存在靶向关系;qRT-PCR的检测结果表明盐穗木同化枝中的HcmiR397a受到盐、干旱和低温胁迫的显著诱导;异源表达HcmiR397a增强转基因拟南芥对低温胁迫的耐性.

1 材料与方法

1.1 植物材料与胁迫处理

盐穗木种子播种到充填基质(蛭石:珍珠岩:花土的体积比为1:1:3)的花盆中,置于自然光(16 h光照/8 h黑暗)、温度25~28 °C、相对湿度20%~30%的温室下培养70 d左右. 将生长一致的盐穗木植株进行600 mmol/L NaCl、1 000 mmol/L Mannitol和低温4 °C的胁迫处理3 h,取其同化枝,处理组 and 对照组各3份重复样本,液氮速冻并保存于-80 °C冰箱.

本氏烟草在上述温室环境下培养4 w后,用于HcmiR397a与预测靶基因Hc*LAC17*靶向关系的鉴定实验. 将单拷贝纯合的HcmiR397a转基因拟南芥和WT于温室22~23 °C、16 h光照/8 h黑暗中培养3 w. 将生长一致的植株放入-2 °C低温培养箱5 d,随后转移至温室恢复生长7 d,拍摄植株的生长表型,并统计拟南芥的存活率.

1.2 生物信息学分析

通过psRNATarget软件(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)预测HcmiR397a的靶基因. 使用DNAMAN 5.2对HcmiR397a和公共数据库miRBase(<http://www.mirbase.org/index.shtml>)中拟南芥、葡萄(*Vitis vinifera*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、油菜(*Brassica napus*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和亚麻(*Linum usitatissimum*)成熟体序列进行比对. 使用在线软件Mfold(<http://mfold.rna.albany.edu/q=mfold>)预测HcmiR397a前体序列二级结构.

1.3 克隆HcmiR397a的前体

称取0.1 g盐穗木同化枝,利用植物总RNA提取试剂盒(DP432, Tiangen, 中国)和RNA Free DNase I(D2270A, Takara, 日本)试剂提取植物总RNA;根据M-MLV Reverse Transcriptase试剂盒(2641A, Takara, 日本)和Oligo(dT)₁₈引物反转录合成cDNA. 依据文库中HcmiR397a前体序列,同时兼顾构建植物表达载体pCambia2300,设计带有酶切位点(*Bam*H I、*Sal* I)的HcmiR397a前体特异性引物(HcmiR397a-F, HcmiR397a-R)(表1),克

隆HcmiR397a前体序列,电泳检测,回收目标产物,TA克隆,转化大肠杆菌DH5 α ,对氨基青霉素抗性菌PCR鉴定,正确后送上海生工生物工程股份有限公司测序.

1.4 qRT-PCR检测基因表达

同1.3节的方法提取盐穗木RNA,利用HcmiR397a茎环引物(表1)反转录合成cDNA.以cDNA为模板,使用Power SYBR[®] Green PCR Master Mix试剂(4364344, Applied Biosystems, 美国)和ABI PRISM7500实时定量PCR仪检测HcmiR397a在各处理样本中的表达量.以盐穗木*HcU6*为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[16]并利用GraphPad Prism 5.0软件进行作图分析.

表 1 本实验所使用的引物

实验	引物名称	引物序列(5'~3')
5'RLM-RACE	<i>HcLAC17</i> -GSP2-1	AAGGGAGACGAGGGAGGTCCTTAG
	<i>HcLAC17</i> -GSP2-2	CGCGGTAGTGTGTCAAATGTGC
	5'RACE Outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
	5'RACE Inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
PCR	HcmiR397a-F (<i>Bam</i> H I)	GGATCCAAACATCATTGAGTGCAGCATT
	HcmiR397a-R (<i>Sal</i> I)	GTCGACAAAACATAATTGAATGCAGCG
qRT-PCR	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTTTCGT
	qRT- <i>HcU6</i> -F	GGGGACATCCGATAAAAATTGG
	qRT- <i>HcU6</i> -R	GGACCATTTCTCGATTTATGCGT
	qRT- <i>AtU6</i> -F	TATGAATTACCCGATGGGCAAG
	qRT- <i>AtU6</i> -R	TGGAACAAGACTTCTGGGCAT

1.5 植物表达载体pBI121-*HcLAC17*-*GUS*、pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a的构建

参考pBI121载体上的多克隆位点设计带酶切位点的引物,扩增包含HcmiR397a预测靶基因*HcLAC17*(预测的3个靶基因中的1个)互补片段,引物序列:*HcLAC17*-F(*Xba*I)为TCTAGAATGGCTAGCCCTAACGT;*HcLAC17*-R(*Sma*I)为CCCGGGGATTTAGCTTGGTT.扩增产物电泳检测,回收目标产物、构建至pMD18-T载体(6011, Takara, 日本),连接、转化DH5 α ,经菌液PCR扩增,鉴定正确后送上海生工生物工程股份有限公司测序.测序无误后,将所需片段和pBI121植物表达载体用*Xba*I、*Sma*I这两个限制性核酸内切酶酶切、目标产物回收后,连接、转化DH5 α ,对单克隆的菌,经卡那霉素抗性筛选压扩,提取质粒,进行PCR和酶切鉴定.

将1.3节测序正确的pre-HcmiR397a质粒和pCAMBIA2300载体用同样的两个限制性核酸内切酶(*Bam*H I、*Sal* I)酶切,电泳检测并回收目标产物,连接、转化DH5 α ,经抗生素抗性筛选后,挑取单克隆菌液PCR鉴定.

将以上鉴定好的质粒pBI121-*GUS*、pBI121-*HcLAC17*-*GUS*、pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a分别转化根癌农杆菌EHA105感受态细胞,用于后续在烟草中鉴定二者的靶向关系和实施农杆菌介导HcmiR397a的转基因拟南芥转化.

1.6 GUS组织化学染色和酶活性的检测

含有不同植物表达载体的农杆菌EHA105(pBI121-*GUS*、pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a和pBI121-*HcLAC17*-*GUS*)培养至 OD_{600} 介于0.8~1.0,离心收集,用10 mmol/L MgCl₂和0.1 mmol/L乙酰丁香酮稀释至 OD_{600} 为0.5.将EHA105-pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a和EHA105-pBI121-*HcLAC17*-*GUS*等体积混合,调至 OD_{600} 为1.0,向生长良好的烟草叶片注射500 μ L菌液,注射后的烟草黑暗生长2 d后,转正常培养3 d.

按照Jefferson等^[17]的描述进行GUS组织化学染色和GUS酶活性的检测.注射后的叶片在GUS染色液中孵育12 h,随后浸泡在乙醇梯度(30%、50%和70%浓度)中进行可视化.通过4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)荧光法检测不同重组载体的农杆菌浸染烟草叶片的 β -葡萄糖苷酶活性.每个处理检测6个重复样本的荧光值,通过4-MU标准曲线计算GUS酶活性.

1.7 5'RLM-RACE检测HcmiR397a对预测靶基因*HcLAC17*的切割位点

根据5'RLM-RACE试剂盒指示(634922, Takara, 日本),使用T4RNA连接酶将HcmRNA与5'接头序列相连接,随后Oligo(dT)₁₈逆转录合成含有5'接头序列的5'RACE cDNA,通过接头和基因特异性引物(*HcLAC17*-

GSP2-1、*HcLAC17*-GSP2-2) (表1) 进行两轮巢式PCR, 扩增产物构建至测序载体, 菌液或质粒PCR鉴定正确后, 15个单克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序, 分析并确定具体切割位点.

1.8 HcmiR397a转基因拟南芥的分子鉴定

植物表达重组质粒载体 (EHA105-pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a) 的农杆菌在含有50 mg/L卡那霉素和100 mg/L链霉素的YEB培养基中培养, 采用花序浸染法转化哥伦比亚 (Col-0) 生态型拟南芥. 在含有50 mg/L卡那霉素和100 mg/L羧苄霉素的MS培养基上筛选转化苗, 后续实验选用T₃代单拷贝纯合株系. 根据DNA提取试剂盒说明书 (DP305, Tiangen, 中国) 提取拟南芥基因组DNA, 鉴定HcmiR397a是否整合到拟南芥的染色体上. 以*AtU6*为内参基因, 通过qRT-PCR检测HcmiR397a转基因拟南芥的相对表达量.

1.9 电导率测定

收集0.1 g低温胁迫3 d的拟南芥叶片, 蒸馏水浸泡24 h后使用电导率仪 (DSS-307, 中国上海) 测量溶液电导率 (C1), 煮沸1 h后再次测量溶液电导率 (C2), $C1/C2 \times 100\%$ 即为离子泄露率^[18].

1.10 数据分析

实验数据用Excel和GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析和制图. 所有数据均以“均数±标准差”表示, 当*P*在0.05的显著性水平以下时, 采用*t*检验进行差异分析. 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$). 每个被处理样本都进行3个生物学重复.

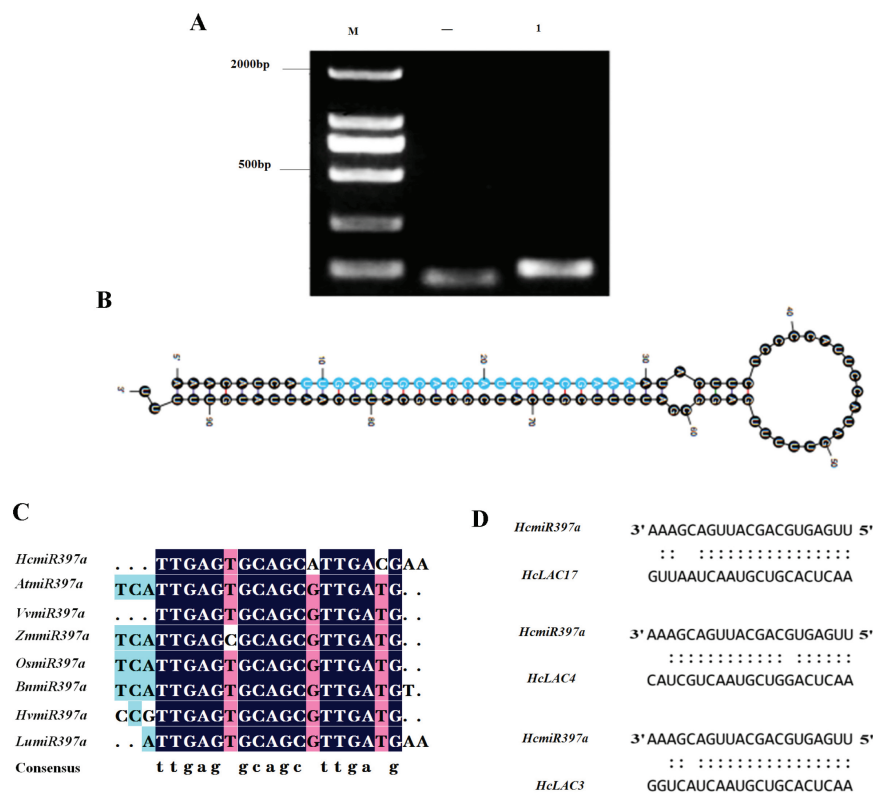


图 1 HcmiR397a前体的克隆与生物信息学分析

注: A为前体的克隆 (“M”为2000 Marker, “-”为阴性对照, “1”为HcmiR397a的前体); B为二级结构; C为成熟体的保守性分析; D为靶基因预测.

2 实验结果

2.1 HcmiR397a的克隆与生物信息学分析

根据盐穗木高盐胁迫下根的小RNA文库和转录组数据, 克隆获得HcmiR397a前体93 bp的序列 (图1A), 测序结果与文库中的序列一致. 通过Mfold软件预测HcmiR397a前体序列的二级结构能够形成茎环结构, 成熟体在

茎环结构的一条臂上(图1B蓝色区域). HcmiR397a前体序列最小折叠自由能指标(MFEI)值约为0.98(表2),高于0.85,属于miRNA^[19],命名为pre-HcmiR397a. miRBase中,拟南芥AtmiR397a、葡萄VvmiR397a、玉米ZmmiR397a、水稻OsmiR397a、油菜BnmiR397a、大麦HvmiR397a和亚麻LumiR397a与HcmiR397a成熟体比对的结果显示miR397a成熟体在不同物种中保守(图1C). 通过分析盐穗木转录组数据,预测HcmiR397a的靶基因为*HcLAC17*、*HcLAC4*和*HcLAC3*,靶向位点在这些基因的编码区(图1D),表明其可能受到HcmiR397a的调控.

表 2 HcmiR397a前体序列基本信息

名称	成熟序列	成熟序列长度/bp	前体序列长度/bp	最小折叠自由能(MEF)	最小折叠自由能指标(MFEI)
HcmiR397a	TTGAGTGCAGCATTGACGAAA	21	93	-39.3	0.98

2.2 HcmiR397a在盐、干旱和低温胁迫下的表达量

为检测HcmiR397a是否响应主要的非生物胁迫,对生长近70 d的盐穗木植株进行盐(600 mmol/L NaCl)、干旱(1 000 mmol/L Mannitol)和低温(4 °C)胁迫的处理3 h, qRT-PCR检测的结果表明:盐穗木同化枝中HcmiR397a的基因表达受到上述胁迫的显著诱导,为对照(用水浇灌)的9~12倍($P < 0.05$)(图2).

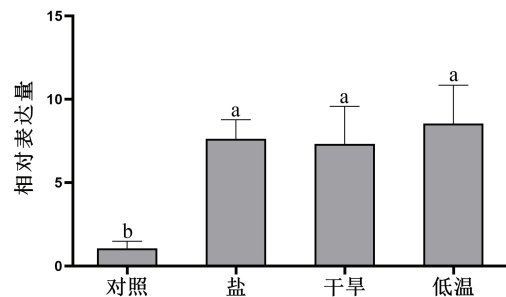


图 2 盐、干旱和低温胁迫下盐穗木同化枝HcmiR397a的表达

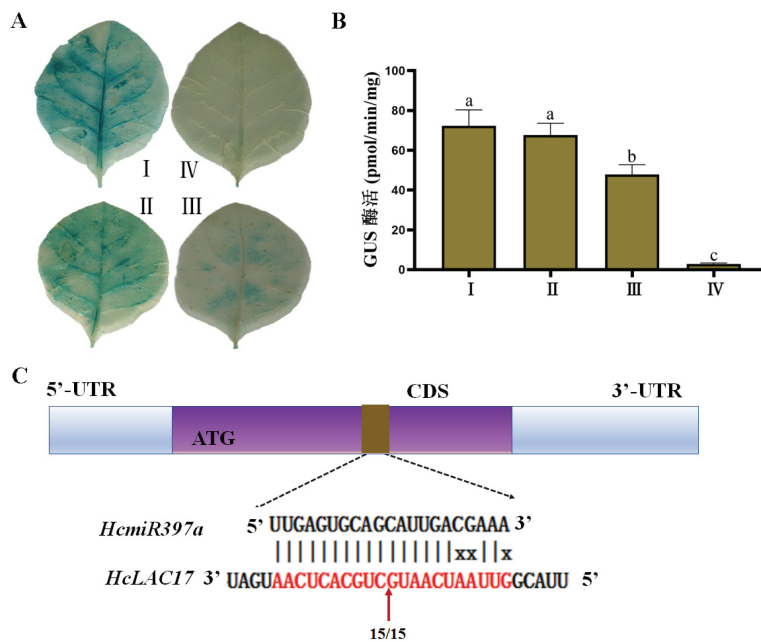


图 3 HcmiR397a与*HcLAC17*靶向关系的实验鉴定

注:A为含有不同载体的农杆菌菌液注射本氏烟草叶片的GUS组织化学染色(I为pBI121-*GUS*;II为pBI121-*HcLAC17-GUS*;III为pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a和pBI121-*HcLAC17-GUS*;IV为pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a);B为GUS酶活性检测;C为5'RLM-RACE确定HcmiR397a对*HcLAC17*的靶向切割位点.

2.3 HcmiR397a与HcLAC17存在靶向切割关系

在盐穗木的转录组中预测HcmiR397a的靶基因为HcLAC17、HcLAC4和HcLAC3。为鉴定靶向性,选择其中1个基因HcLAC17,通过烟草瞬时表达体系鉴定HcmiR397a与HcLAC17之间是否存在靶向关系。根据GUS的染色结果,将含有GUS报告基因的阳性对照(空载体的农杆菌)和HcLAC17的重组载体的农杆菌(I和II)菌液分别注射烟草叶片后观察到着色较深的蓝色,将作为阴性对照的pCAMBIA2300-pre-HcmiR397a载体的农杆菌(IV)菌液注射烟草叶片后,无GUS基因表达,也未观察到染色,而注射转化HcmiR397a和HcLAC17的重组载体的农杆菌(III)菌液的烟草叶片,与阳性对照相比,III组的烟草叶片GUS的染色范围变小,染色变浅(图3A)。

为进一步证实GUS组织化学染色的观察结果,采用MUG法检测不同重组载体的农杆菌菌液注射烟草叶片后的GUS酶活性。结果显示:阳性对照(I和II)中GUS酶活性最高,阴性对照(IV)GUS酶活性最低,共转化HcmiR397a和HcLAC17重组载体的农杆菌(III)菌液注射的烟草叶片导致GUS酶活性与阳性对照相比显著下降(图3B)。这些结果表明HcmiR397a对HcLAC17在mRNA水平存在靶向切割。

通过5'RLM-RACE实验,进一步鉴定了HcmiR397a在第10~11碱基处(红色箭头指示)对HcLAC17进行准确切割(图3C)。

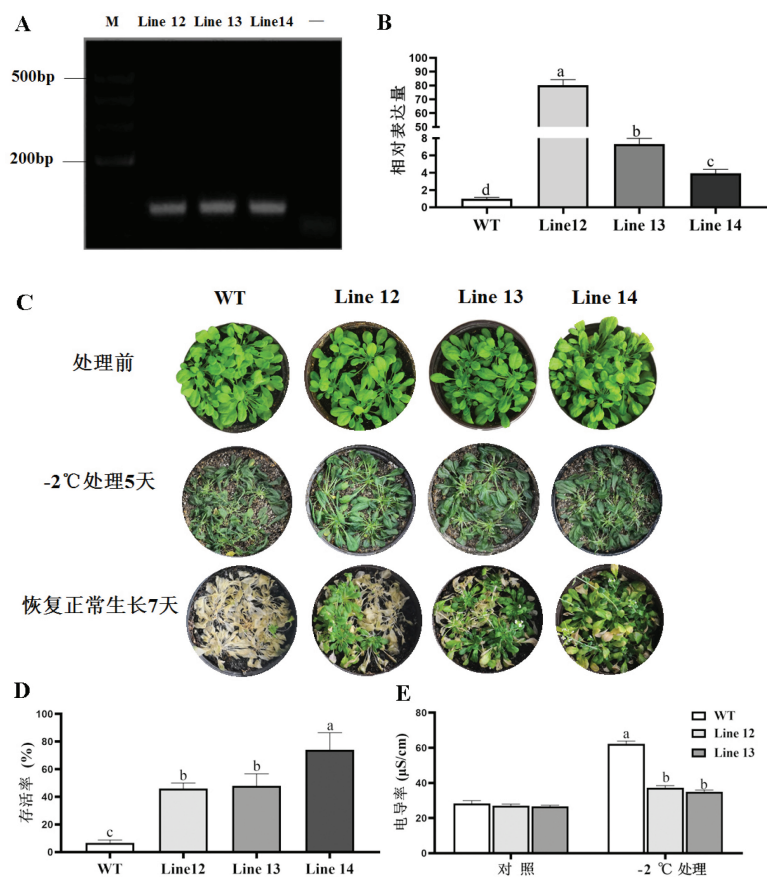


图 4 HcmiR397a的过表达增强拟南芥的低温抗性

注: A为基因组PCR检测3个HcmiR397a转基因株系是否实现了拟南芥基因组的整合(“M”为2000 Marker;“-”为阴性对照;Line12、Line13、Line14为HcmiR397a单拷贝拟南芥纯合株系);B为以AtU6为内参、qRT-PCR技术检测miR397a在WT和3个转基因株系中的相对表达量;C为WT和过表达HcmiR397a的转基因拟南芥低温胁迫5 d、然后恢复生长7 d的表型;D为存活率统计;E为低温胁迫3 d后的电导率检测。

2.4 过表达HcmiR397a提高拟南芥的低温耐性

为阐明HcmiR397a基因的功能,本文利用农杆菌介导的花序浸染法将HcmiR397a稳定转化到拟南芥,通过抗生素持续的压力筛选,使用3个T₃代符合3:1转基因拟南芥的纯合株系(Line12、Line13、Line14)进行后续实验。DNA水平的检测结果显示:HcmiR397a已整合到拟南芥的基因组中(图4A);qRT-PCR的数据表明3个转基

因株系的miR397a的相对表达量明显高于WT(图4B)。

为确定HcmiR397a转基因拟南芥在低温胁迫下的表现,对3 w龄的转基因拟南芥和WT进行低温胁迫处理。如图4C所示,将-2 °C胁迫处理5 d的植物转移到正常生长条件下恢复生长7 d时,野生型拟南芥大多数植株叶片变黄枯萎,植株停止生长或死亡;相较之下,过表达HcmiR397a的转基因拟南芥在低温胁迫后恢复正常生长条件,叶片大部分呈现绿色,转基因株系的存活率(60%)显著高于WT(5%)(图4D),而且过表达HcmiR397a拟南芥在低温处理3 d后,电导率值明显低于WT(图4E),以上结果表明:低温胁迫对野生型拟南芥造成的损害更大,HcmiR397a的异源表达增强了拟南芥对低温胁迫的耐性。

3 讨论

植物miRNA的靶基因大多为编码调控蛋白的转录因子。盐穗木为极端耐逆的盐生植物,生长于干旱盐碱荒漠昼夜温差大的地区,开展非生物抗性的研究在选材上具有特色和针对性^[20]。本课题组建立了600 mmol/L NaCl处理的盐穗木根的小RNA文库^[15],从中筛选差异表达的HcmiR397a为候选基因,结合转录组数据,获得HcmiR397a前体并预测靶基因为*HcLACs*。克隆的pre-HcmiR397a基本信息(表2)符合miRNA前体的标准^[19],且HcmiR397a的成熟体在进化中相对保守。拟南芥miR397a的表达在干旱、盐和低温下迅速增加^[9,13]。HcmiR397a基因同样受到盐、干旱和冷的强烈诱导(图2)。以上结果表明:HcmiR397a可能在植物非生物胁迫响应方面发挥重要作用。

miRNA通过切割mRNA或翻译抑制下调靶基因的表达,参与植物的生物学过程。利用生物信息学方法预测miRNA靶基因序列,再根据实验鉴定真实的靶向关系。主要以绿色荧光蛋白(*GFP*)和*GUS*为报告基因,通过检测烟草瞬时表达体系中*GFP*的荧光或者*GUS*的染色确定miRNA与靶基因是否发生互作^[3,21]。本文将含有HcmiR397a靶位点的靶基因*HcLAC17*片段和HcmiR397a前体(pre-HcmiR397a)分别构建到含有*GUS*报告基因的pBI121和pCAMBIA2300载体中,利用农杆菌介导的烟草瞬时转化体系结合*GUS*的组织化学染色和酶活性鉴定出HcmiR397a与*HcLAC17*存在靶向关系(图3A~B),进一步通过5'RLM-RACE技术充分确定了HcmiR397a对*HcLAC17*基因的准确切割位点(图3C)。湖北海棠(*Malus hupehensis*)^[22]、杨树(*Populus trichocarpa*)^[23]、水稻^[24]和狗尾草^[12]中,也通过这项技术确定了miR397在第10~11个碱基处对靶基因*LAC*的切割。本文结果与上述文献报道的一致,说明miR397对靶基因的作用在进化上也是保守的。

为确定HcmiR397a在植物非生物胁迫方面的作用,本文在拟南芥中过表达HcmiR397a,利用3个表达量较高的单拷贝转基因纯合株系(图4A~B)进行低温胁迫的功能鉴定。与WT相比,低温胁迫下转基因拟南芥表现更好的生长表型、更高的存活率和低的电导率(图4),表明过表达HcmiR397a提高了转基因植株的低温耐受性。拟南芥中,AtmiR397a通过上调冷响应基因*CBF2*和*COR*基因的表达,同样增强了转基因拟南芥的低温耐受性^[13]。miR397a成熟体序列在进化上保守,HcmiR397a可能参与调控冷响应基因的表达以增强转基因拟南芥的低温耐受性,但是HcmiR397a是否通过*HcLACs*参与冷调控,以及盐穗木*LACs*是否响应逆境胁迫、进而调控冷响应基因的表达发挥植物对低温胁迫的抗性,这些问题都需要深入的探讨和解析。

4 结论

通过实验的手段确定了HcmiR397a对*HcLAC17*的靶向性;利用拟南芥的遗传转化平台,确定了HcmiR397a能够提高转基因拟南芥对低温胁迫的抗性。

参考文献:

- [1] ROGERS K, CHEN X M. Biogenesis, turnover and mode of action of plant microRNAs[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(7): 2383-2399.
- [2] WANG C, HAN J, KORIR N K, et al. Characterization of target mRNAs for grapevine microRNAs with an integrated strategy of modified RLM-RACE, newly developed PPM-RACE and qPCRs[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(10): 943-957.
- [3] GAO P, BAI X, YANG L, et al. Over-expression of osa-miR396c decreases salt and alkali stress tolerance[J]. *Planta*, 2010, 231(5): 991-1001.
- [4] SHANGGUAN L F, SONG C N, HAN J, et al. Characterization of regulatory mechanism of *Poncirus trifoliata* microRNAs on their target genes with an integrated strategy of newly developed PPM-RACE and RLM-RACE[J]. *Gene*, 2014, 535(1): 42-52.
- [5] POURCEL L, ROUTABOUL J M, KERHOAS L, et al. Transparent TESTA10 encodes a laccaselike enzyme involved in oxidative

- polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966-2980.
- [6] JONES-RHOADES M W, BARTEL D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA[J]. *Molecular Cell*, 2004, 14: 787-799.
- [7] RANOCHA P, CHABANNES M, CHAMAYOU S, et al. *Laccase* down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar[J]. *Plant Physiology*, 2020, 129: 145-155.
- [8] ARCURI M L C, FIALHO L C, NUNES-LAITZ A V, et al. Genome-wide identification of multifunctional *Laccase* gene family in *Eucalyptus grandis*: potential targets for lignin engineering and stress tolerance[J]. *Trees*, 2020, 34: 745-758.
- [9] SUNKAR R, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001-2019.
- [10] FERREIRA T H, GENTILE A, VILELA R D, et al. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane(*Saccharum* spp.)[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46703.
- [11] 向娟, 林鹏, 李兴盛, 等. 过表达番茄*Sly-miR397*基因增强拟南芥的耐旱性[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(10): 51-58.
- [12] NGUYEN D Q, BROWN C W, PEGLER J L, et al. Molecular manipulation of microRNA397 abundance influences the development and salt stress response of *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7879-7902.
- [13] DONG C H, PEI H. Over-expression of *miR397* improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 57(4): 209-217.
- [14] WANG C Y, ZHANG S, YU Y, et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(8): 1132-1142.
- [15] YANG R R, ZENG Y L, YI X Y, et al. Small RNA deep sequencing reveals the important role of microRNAs in the halophyte, *Halostachys caspica*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(3): 395-408.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [18] 龚萍, 王健. 利用电导率法测定六种芳香植物的耐热性[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(10): 2038-2040.
- [19] ZHANG B H, PAN X P, COX S B, et al. Evidence that miRNAs are different from other RNAs[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 63(2): 246-254.
- [20] 郝金标, 张福锁, 毛达如, 等. 新疆盐生植物群落物种多样性及其分布规律的初步研究[J]. *林业科学*, 2006, 42(10): 6-12.
- [21] FENG B Z, LI P Q, FU L, et al. Exploring *Laccase* genes from plant pathogen genomes: a bioinformatic approach[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 14019-14036.
- [22] YU X Y, GONG H Y, CAO L F, et al. MicroRNA397b negatively regulates resistance of *Malus hupehensis* to *Botryosphaeria dothidea* by modulating *MhLAC7* involved in lignin biosynthesis[J]. *The Plant Science*, 2020, 292(1): 110390-110425.
- [23] LU S F, LI Q Z, WEI H R, et al. Ptr-miR397a is a negative regulator of *Laccase* genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(26): 10848-10853.
- [24] ZHANG Y C, YU Y, WANG C Y, et al. Over-expression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 848-852.

责任编辑: 张自强