

张 洁. 干旱盐碱共胁迫下玉米 miR398 的表达[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 45–47.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.012

# 干旱盐碱共胁迫下玉米 miR398 的表达

张 洁

(南通大学农业部南方平原玉米科学观测实验站, 江苏南通 226001)

**摘要:**分析干旱盐碱共胁迫下玉米 miR398 的表达变化, 阐明 miR398 与玉米水势胁迫生理指标关系。干旱盐碱共胁迫处理 72 h, 利用 qRT-PCR 技术分别验证了 miR398 及其他对应的靶基因在盐胁迫条件下的表达变化情况; 应用 ELISA 和茚三铜方法分别检测玉米的 ABA (脱落酸) 和脯氨酸含量。结果表明: 经过干旱盐碱共胁迫处理, 玉米出现了明显的水分亏缺症状, 24、48、72 h 各处理组玉米 ABA 和脯氨酸含量与对照组比较上升明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); RT-PCR 检测显示, 24、48、72 h 各处理组玉米中 miR398 的表达比对照组显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明干旱盐碱共胁迫条件下玉米 miR398 表达下调, 可能参与抗逆相关基因 ABA 的调控。试验为后续抗旱抗盐碱玉米遗传性状研究提供了基础数据。

**关键词:**玉米; 干旱; 盐碱; miR398

**中图分类号:** S513.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0045-03

玉米 (*Zea mays* L.) 是世界三大粮食作物之一, 它的产量对世界粮食的供给有着重要的影响<sup>[1]</sup>。非生物因子中干旱是引起玉米减产的最为重要的胁迫因子<sup>[2]</sup>, 干旱胁迫是植物逆境最普遍的形式, 在许多地区是农业发展的瓶颈, 每年全世界玉米产量损失中的几乎一半是由干旱造成的。特别是在实际生产中干旱胁迫往往也伴随着盐碱的胁迫危害。统计现实表明, 我国平均每年受旱面积 0.22 亿  $\text{hm}^2$ , 成灾面积 0.09 亿  $\text{hm}^2$ , 直接减收粮食 100 亿 kg 以上<sup>[3]</sup>。应用分子遗传学方法研究作物抗旱抗盐碱机制并通过基因工程培育新的作物品种已成为现代农业研究的重要目标。

Small RNA 是一类非编码的、能够在转录水平和转录后水平调控基因表达的小分子 RNA。最近的研究表明, 植物在多种逆境胁迫下存在着 micro RNA (miRNA) 的诱导表达并证实了某些 miRNA 在植物感受逆境胁迫而作出适应性调整的过程中发挥着重要的作用<sup>[4-5]</sup>。随着研究的深入, miRNA 将为我们阐明植物耐胁迫机理和提高植物耐胁迫能力提供重要的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂与仪器

玉米幼苗营养液培养所需试剂及药品: 液氮, Trizol (Invitrogen), 三氯甲烷, 异丙醇, 无水乙醇, DEPC, 无 RNA 酶双蒸水。试剂盒: Reverse Transcription System (Promega), TaqMan RmicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)。主要仪器: NANO 2000 紫外分光光度计 (Thermo), 普通 PCR 仪 (伯乐),

ABI 7300 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)。

### 1.2 方法

1.2.1 玉米处理和收集 试验选用玉米品系 YQ7-96, 玉米种子催芽后待根长 2~3 cm 时, 点种于营养盘中, 用 Hoagland 营养液培养, 置于网室。处理组在三叶一心期 (苗期, 长度为 20 cm), 每盆浇 5 L 含 100 mmol/L 混合盐 (50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 的 Hoagland 液作为盐胁迫处理组和含 25 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ 、25 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 Hoagland 液 (pH 值 11, 水势为 -0.7 MPa) 作为碱共胁迫处理。0、24、48、72 h 后分别取根茎和叶组织, 立即用液氮冷冻后保存于 -80 °C 备用, 每个样品取 3 次生物学重复。

1.2.2 总 RNA 提取 miRNA 反转录茎环 RT 引物设计依据 50 nt 可自行折叠成茎环结构的寡核苷酸, 序列如下: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG-ACNNNNNN-3', 3'端的 6 个 N 代表与成熟 miRNA 3'端反向互补的 6 个碱基。用于 miRNA 荧光定量的反向引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3', 该引物实际上为 RT 引物上的一部分, 对所有 miRNA 来说是通用的。正向引物利用 Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 设计, 基础序列为目标 miRNA 成熟序列, 根据对引物的长度、 $T_m$  值及 GC 含量的要求再用软件进行调整, 可在 5'端加 2~3 个 GC 以增加退火温度, 平衡 GC 含量。

1.2.3 miRNA 反转录 利用 TaqMan RmicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 试剂盒反转录 miRNA, 内参选择 18S rRNA。

1.2.4 miRNA 荧光定量 PCR 利用 ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 荧光定量 PCR 仪进行 miRNA 荧光定量 PCR 反应。荧光定量 PCR 试剂盒采用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ II, 并以 18S rRNA 作为内参对照, miR398a 引物序列如下: 5'-ATTCGCACTGGATACGACCGGGG-3', 5'-GCCGCTGTGTCTCAGGTC-3', 退火温度为 58 °C。

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 农业部南方平原玉米科学观测实验站开放课题 (编号: NT201514)。

作者简介: 张 洁 (1980—), 男, 安徽舒城人, 博士, 副教授, 主要从事玉米表观遗传学研究。E-mail: zhangjie@ntu.edu.cn。

**1.2.5 脱落酸(ABA)的含量** ABA 含量测定方法依据中国农业大学的 ELISA 试剂盒说明书,并参考酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定内源植物激素。

**1.2.6 脯氨酸的含量** 脯氨酸含量测定方法是依据茚三酮比色法<sup>[6]</sup>。

**1.2.7 数据统计** PCR 反应结束后,手动设置合适的阈值,之后导出  $C_T$  值数据,利用  $\Delta\Delta C_T$  法衡量 miRNA 及其靶基因在不同样品中的差异表达水平。对于特定时间点的处理样品,有以下表达式:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{miRNA 干旱盐碱处理组}} - C_{T, \text{18S rRNA, 干旱盐碱处理组}}) - (C_{T, \text{miRNA, 对照组}} - C_{T, \text{18S rRNA, 对照组}})$$

统计分析采用 Stata 统计分析软件,比较各试验组与对照组间的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 非生物胁迫处理的玉米和正常条件下玉米

玉米种子经过催芽后盆栽于温室中。待苗生长至雌雄分化盛期(大喇叭口期,约 12 张真叶),观察玉米生长情况,以保证玉米生长良好且均一,无明显形态差异,此时将玉米材料分为处理组和对照组。48 h 后,对照组玉米叶片舒展生长良好;处理组玉米叶片卷蔫,且有黄叶出现,表现为典型的水分亏缺症状(图 1)。

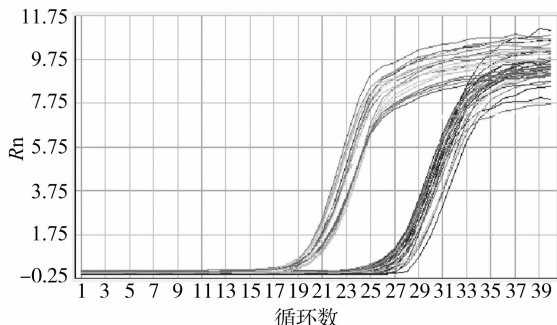


对照组 干旱和盐碱共胁迫组

图1 干旱、盐碱共胁迫48 h后的玉米YQ7-96

### 2.2 在干旱和盐碱共胁迫条件下玉米 miR398 表达模式

熔解曲线可用来衡量引物质量的好坏,较好的引物具有较高的扩增效率,不会形成引物二聚体或产生错配。可从曲线形状看出 miR398 和内参(18S rRNA)PCR 扩增过程熔解曲线呈现“S”形(图 2),这表明 PCR 扩增试验进行良好。



2簇曲线分别代表18S rRNA(左)和miR398(右)

图2 miR398 实时定量 PCR 扩增曲线

为了进一步探索 miRNA 在盐胁迫条件下的表达变化情况,利用 qRT-PCR 技术检测玉米 miR398b 在干旱盐碱共胁迫

条件下(0、24、48、72 h)变化情况。图 3 结果显示,24、48、72 h 的处理组 miR398 表达量与对照组相比明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中,72 h 处理组 miR398 表达量下降最为明显。

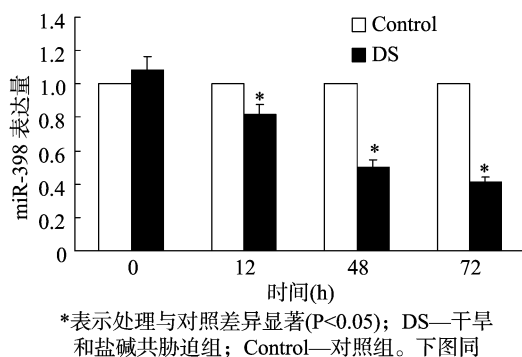


图3 干旱和盐胁迫条件下玉米 miRNA-398 表达变化情况

### 2.3 干旱盐碱共胁迫下玉米脱落酸和脯氨酸含量的变化

在干旱盐碱共胁迫处理后,通过 ELISA 技术测定对照和处理 2 组玉米幼苗样品的细胞内源 ABA、脯氨酸含量。图 4 结果表明,与对照组相比,24、48、72 h 的处理组玉米脱落酸累积量与对照组相比明显上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );同样,与对照组相比,24、48、72 h 的处理组玉米脯氨酸累积量与对照组相比明显上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果还显示,72 h 处理组玉米 ABA 和脯氨酸累积量上升最为明显。表明干旱胁迫触发玉米幼苗体内 ABA 和脯氨酸等化合物的表达,进而引起 ABA 信号的转导。

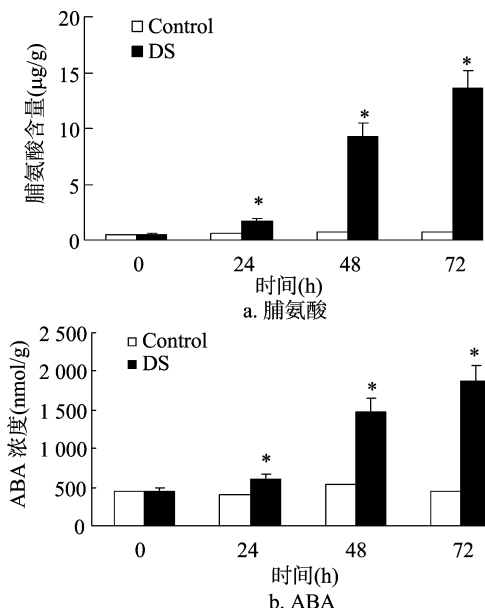


图4 不同干旱盐碱共处理时期玉米叶片中 ABA 和脯氨酸含量变化

## 3 讨论

植物中的小 RNA 在植物的生长发育、组织器官的形态建成、逆境应答和信号转导等过程中发挥重要的调控作用。通过对靶基因预测和功能分析后发现,某些胁迫(旱、盐碱、热、冷、冻)诱导的 miRNA 还直接参与植物逆境胁迫下的适应性反应。尤其是 miRNA 在植物非生物环境胁迫应答中的调控

作用日益受到重视<sup>[7]</sup>。miRNA389可以同时受这4种非生物因素胁迫的调控。在转基因拟南芥中研究进一步揭示miRNA398在调控CSD2基因表达中和氧化胁迫中的重要作用。而干旱、严寒和盐分则会影响植物miR319c、miR393、miR395、miR397b和miR402的表达水平<sup>[8]</sup>。实际上,Sunkar等构建了拟南芥幼苗经脱水、高盐、低温和ABA胁迫处理后的小分子RNA文库并对文库的测序结果进行分析,发现了26个新的miRNAs,它们来源于15个新的miRNA家族<sup>[9]</sup>。但是,miRNA在植物抗逆反应中作用的分子机制目前还不清楚,有待进一步研究。

氧化应激反应是玉米在多种逆境胁迫环境下的生理反应,氧化应激反应可导致玉米体内脯氨酸的含量显著增加。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。同时,在玉米叶片中ABA诱导产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能通过促发促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)引起的级联反应来调节一些抗氧化酶类基因的表达,进一步增强抗氧化酶类的活性,最终启动氧化防御系统<sup>[10]</sup>。本试验结果显示,miR398在干旱盐碱胁迫过程中参与靶基因ABA和脯氨酸的抗氧化防御机制的调控。因此我们认为:miR398可以通过增加ABA的累积,进而激活ABA诱导的抗氧化防御系统,且此过程还涉及到脯氨酸。

试验过程中玉米盐碱处理浓度是获得相关基因表达的重要因素。目前,国内外对玉米耐盐碱性鉴定还没有形成统一的、权威的耐盐碱性鉴定浓度,大部分研究者都是根据自身的鉴定方法、处理溶液选取不同的鉴定浓度,而且在操作过程中的误差或人为因素都有可能造成鉴定浓度的不同<sup>[11-13]</sup>。因此,本试验中对耐盐碱性鉴定浓度的筛选是很必要的。本研究最终确定的玉米苗期盐性处理浓度为100 mmol/L,确定的玉米苗期碱处理浓度为35 mmol/L;刘芳等研究表明,NaCl浓度为250 mmol/L是玉米苗期耐盐性筛选的理想浓度<sup>[14]</sup>;崔美燕的研究表明,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>浓度为25 mmol/L可以作为玉米苗期耐碱性鉴定的理想浓度<sup>[15]</sup>。另外,玉米在苗期的耐盐碱性很重要,因为植株苗期的生长情况影响其最终的产量。本试验是在选取玉米对盐碱胁迫最敏感的“3叶1心”期进行盐碱胁迫处理3 d。

本试验中使用的耐盐碱性鉴定浓度与其他人的研究存在一定的差异,并使用较重的胁迫参数。这样更有利于获得特异性相关miRNA表达。此外,崔美燕等采用苗情评价的方法对玉米自交系幼苗进行耐盐、碱性鉴定,根据盐或碱胁迫处理7 d后苗情观察来评价玉米材料的耐盐、碱性性状,非常直观、简单<sup>[15-16]</sup>。为了检测玉米对干旱盐碱胁迫的早期反应,在试验中收集处理3 d后的玉米混合组织作为抽提RNA的材料。

本研究建立了盐、碱和旱共胁迫下的玉米品系YQ7-96模型,检测miR398在不同处理时期的表达水平,并验证miR398表达与多个玉米抗旱指标(ABA和脯氨酸)的相关性。研究发现,在玉米幼苗植株中miR398表达在干旱盐碱共处理后被抑制,而基因ABA和脯氨酸在处理组的玉米叶片

中也被大量诱导表达。试验将初步阐明由miRNA介导的玉米幼苗干旱胁迫响应机制的调控网络,为更好地理解植物耐旱分子机理提供试验数据。

## 参考文献:

- [1] Gwirtz J A, Garcia - Casal M N. Processing maize flour and corn meal food products[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2014, 1312: 66 - 75.
- [2] Ciniglia C, Mastrobuoni F, Scortichini M, et al. Oxidative damage and cell - programmed death induced in *Zea mays* L. by allelochemical stress [J]. Ecotoxicology, 2015, 24(4): 926 - 937.
- [3] 张正斌, 徐 萍, 张建华, 等. 作物抗旱节水相关基因的标记和克隆及转基因研究进展[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1537 - 1544.
- [4] Ferdous J, Li Y, Reid N, et al. Identification of reference genes for quantitative expression analysis of microRNAs and mRNAs in barley under various stress conditions [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118503.
- [5] Zhou M, Luo H. Role of microRNA319 in creeping bentgrass salinity and drought stress response [J]. Plant Signal Behav, 2014, 9(4): e28700.
- [6] 李绍军, 龚月桦, 王俊儒, 等. 关于茛三酮法测定脯氨酸含量中脯氨酸与茛三酮反应之探讨[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 365 - 368.
- [7] Wang Y G, An M, Zhou S F, et al. Expression profile of maize microRNAs corresponding to their target genes under drought stress[J]. Biochemical Genetics, 2014, 52(11/12): 474 - 493.
- [8] Syu Y Y, Hung J H, Chen J C, et al. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 83: 57 - 64.
- [9] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. The Plant Cell, 2006, 18(8): 2051 - 2065.
- [10] Zhao M, Tai H, Sun S, et al. Cloning and characterization of maize miRNAs involved in responses to nitrogen deficiency [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29669.
- [11] 冯 艳, 周 蓉, 付 蓉, 等. 玉米遗传多样性分析及耐盐种质筛选[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 59 - 61.
- [12] 汤菊香, 赵元增, 单长卷. 水杨酸对盐胁迫下新单29玉米幼苗生理特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 93 - 95.
- [13] 岳润清, 铁双贵, 韩小花, 等. 农杆菌介导的转拟南芥 *AtCHX23* 基因玉米及其耐盐性[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 726 - 732.
- [14] 刘 芳, 付 艳, 高树仁, 等. 玉米幼苗的盐胁迫反应及玉米耐盐性的鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(6): 22 - 26.
- [15] 崔美燕. 玉米苗期耐碱种质资源评价及盐碱条件下部分性状遗传分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- [16] 付 艳, 高树仁, 王振华. 玉米种质苗期耐盐性的评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(1): 36 - 39, 50.