

王 红,毋若楠,王争艳,等. NaCl 胁迫下 zma - miR059 的表达及其抗盐性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(16):31-34.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.16.007

# NaCl 胁迫下 zma - miR059 的表达及其抗盐性分析

王 红,毋若楠,王争艳,杨成成,武永军

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨陵 712100)

**摘要:**以先玉 335 玉米为材料,研究笔者在前期试验中获得的 zma - miR059 在 NaCl 处理后的表达水平,测定处理植株叶片和根系中丙二醛(malonaldehyde,简称 MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)、过氧化物酶(peroxidase,简称 POD)、过氧化氢酶(catalase,简称 CAT)活性变化。结果显示:zma - miR059 表达量在分根 NaCl 胁迫和全根 NaCl 胁迫后均有上升;胁迫后 SOD、POD 的活性及 MDA 含量与 zma - miR059 的表达水平变化趋势一致,表明 zma - miR059 与盐胁迫相关。为了进一步研究 zma - miR059 的抗盐作用机制,构建了 STTM 表达载体,以期通过转基因试验进一步揭示其功能。

**关键词:**NaCl 胁迫;玉米;zma - miR059;STTM

**中图分类号:**S513.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)16-0031-04

土壤盐渍化导致环境退化,严重影响着作物的生长及产量。土壤中盐离子浓度过高会造成植物根系吸水困难,使植物体内含水量下降,膨压降低,引起植物细胞脱水死亡,甚至影响植物自身的生存<sup>[1]</sup>。目前,我国大约有 0.33 亿  $\text{hm}^2$  盐碱地,而大量农作物耐盐性差,在盐碱地中无法种植,因此,如何提高农作物的耐盐性,对扩大我国耕地面积具有现实意义。

miRNAs 是植物体内普遍存在的一类小分子非编码 RNA,其长度在 24 nt 左右<sup>[2]</sup>。miRNAs 广泛参与植物的生长发育、形态建成、果实发育、对生物和非生物胁迫的响应等过程<sup>[3]</sup>。研究发现,拟南芥<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>中都存在响应盐胁迫的 miRNAs。目前研究 miRNAs 功能的方法有过表达和基因沉默等。胡娟等发现,在拟南芥中过表达番茄的 miR397 能够增强拟南芥的抗旱性<sup>[6]</sup>。2014 年 Gu 等构建了沉默 miR165/166 的 STTM(short tandem target mimic,即短串联靶标模拟)载体,导致转基因棉花中靶标基因的表达量明显上升<sup>[7]</sup>。

当土壤环境中盐离子浓度较高时,会破坏植物细胞内的离子平衡,引起膜功能异常,代谢活动减弱,从而影响生长<sup>[8]</sup>。当植物受到非生物胁迫时,活性氧积累且高度活跃,刺激植物通过抗氧化酶级联反应来清除活性氧<sup>[9]</sup>,使植物体内清除活性氧相关酶超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)、过氧化物酶(peroxidase,简称 POD)、过氧化氢酶(catalase,简称 CAT)等活性升高<sup>[10-11]</sup>。此外,在胁迫下,细胞膜会发生膜脂过氧化,产生丙二醛(malonaldehyde,简称 MDA),因此,可以通过丙二醛了解膜系统受伤害的程度<sup>[12]</sup>。保护酶活性及 MDA 含量已被广泛用来衡量植物受胁迫的程度。

笔者所在实验室在之前利用高通量测序研究了 NaCl 处

理下玉米 miRNAs 的表达,发现 zma - miR059 的表达量在 NaCl 胁迫下显著上升。因此本研究以先玉 335 为试验材料,试图明确 zma - miR059 与盐胁迫的关系,以期从转录后调控角度改进植物的耐盐性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 玉米品种和接种的菌株 玉米品种为先玉 335,载体 pOT2 - Poly - cis ,pFGC5941 - *PacI* 和农杆菌 GV3101 为笔者所在实验室保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料处理和样品采集 将玉米种子进行消毒、萌发处理,当玉米芽长到 2 cm 时,用棉花包裹种子,留出根部,插入自制的玉米水培盆小孔中,每天用通气泵通气 3 次。用蒸馏水培养 3 d 后换 Hoagland 培养液培养至三叶期,挑出长势一致的玉米幼苗进行处理。分根处理(将玉米根系分为大致相等的 2 个部分):将 2 个部分的根分别放入正常的 Hoagland 培养液和含有 200 mmol/L NaCl 的 Hoagland 培养液中。全部根系 NaCl 处理:将玉米根系全部放入含有 200 mmol/L NaCl 的 Hoagland 培养液中。对照:将全部根系放入不含 NaCl 的 Hoagland 培养液中,培养 2 d 后,取样进行试验,每个处理设置 3 个重复。

培养条件:光—暗周期为 15 h—9 h,昼—夜温度周期为 28  $^{\circ}\text{C}$ —20  $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 RNA 提取和反转录 用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取叶片和根系总 RNA。提取 RNA 后用 GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System(Promega,上海)进行反转录,严格按照试剂盒说明书进行操作。反转录参照 Chen 等发明的 stem - loop RT - PCR,设计反转录引物:5' - GTCGTA TCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGAC GATC - 3'(5'末端是 44 个固定碱基,3'末端的 8 个碱基与 miRNA 成熟体的 3'端互补配对)<sup>[13]</sup>。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 2.5  $\mu\text{L}$  总 RNA、4  $\mu\text{L}$  反应缓冲液、1  $\mu\text{L}$  反转录引物、2  $\mu\text{L}$

收稿日期:2017-03-20

基金项目:神华集团科技创新项目(编号:01300/K403021408)。

作者简介:王 红(1989—),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为植物逆境分子生物学。E-mail:437511974@qq.com。

通信作者:武永军,博士,副教授,研究方向为植物逆境分子生物学。

E-mail:wuyongjun@nwfufu.edu.cn。

MgCl<sub>2</sub>、1 μL dNTPs、1 μL RNA 酶抑制剂、1 μL 反转录酶, 7.5 μL 水。反应条件:25 ℃ 5 min,42 ℃ 1 h,75 ℃ 15 min。  
1.2.3 实时定量 PCR 实时荧光定量 PCR 采用 Promega 公司的 GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, 操作严格按照说明书进行。选择 18S rRNA 为内参,zma-miR059 和内参的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。反应体系为

20 μL: 10 μL 2 × GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix,7.4 μL 水,各 0.3 μL 上、下游引物(10 μmol/L),2 μL cDNA。反应条件: 95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。在 65~95 ℃,每升高 0.5 ℃ 采集 1 次荧光,生成溶解曲线。每个样品设置 3 个重复,阴性对照以 ddH<sub>2</sub>O 为模板。表达量采用相对定量 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算。

表 1 实时定量 PCR 引物

引物名	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')
zma-miR059	ATCATGGCAGTGAGATCGTCGG	GTGCAGGGTCCGAGG
18S rRNA	AGTTTGAGGCAATAACAGGTCT	GATGAAATTTCCCAAGATTACC

1.2.4 SOD、CAT、POD 活性及 MDA 含量的测定 参照高俊凤的方法进行 CAT、SOD、POD 活性和 MDA 含量的测定,均为鲜质量活性或含量<sup>[14]</sup>。  
1.2.5 zma-miR059 STTM 表达载体的构建 zma-miR059 的序列为 5'-ATCATGGCAGTGAGATCGTCG-3',参照 Yan 等的方法<sup>[15]</sup>设计 zma-miR059 的 STTM 序列,整段序列如

下:5'-CATTTTGGAGAGGACAGCCCCGACGATCTCATAGCTGCCATGATGAATTCGGTCCATGATGTTGTTGTTGTTATGGTCTAATTTAAATATGGTCTAAAGAAGAAGAATCGACGATCTCATAGCTGCCATGATGTTGACGCTGAAATCACCAG-3'。根据上述序列设计引物,构建 STTM-zma-miR059 表达载体,引物序列详见表 2。

表 2 构建 STTM-zma-miR059 的引物

类别	引物名称	序列(5'→3')
构建 STTM 的引物	zma-miR059-F	GCCATTTAAATATGCTCTAAAGAAGAAGAATCGACGATCTCATAGCTGCCATGATGAATTCGGTACGCTGAAATCACCAG
	zma-miR059-R	GCCATTTAAATTAGACCATAACAACAACAACATCATGGCAGCTATGAGATCGTCGAAGCTTGGGCTGTCTCTCCAAATG
pOT2-STTM	STTM-F	CATTTTGGAGAGGACAGCCCAAG
验证引物	STTM-R	CTGGTGATTTCAGCGTACCGAA
删除起始位点的引物	PacI-P-F	TCCCTTAATTAAGTTTGCAAGCAGCAGATTACGGC
	PacI-P-R	TCCCTTAATTAAGAAAGCGGGACAGGTATCCGGTAAG

以 pOT2-Poly-Cis 质粒为模板,PCR 扩增 STTM(KOD-Plus-Neo,日本),对 PCR 产物进行回收纯化[天根生化科技(北京)有限公司],用 *Swa*[New England Biolabs(NEB)公司,美国]酶切产物,4 ℃ 过夜自连,转化 TOP10 感受态细胞[天根生化科技(北京)有限公司],用卡那霉素(Kan)筛选,选择阳性菌落以 STTM-F、STTM-R 为引物送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序,进行 BLAST 比对。

以连接成功的 pOT2-STTM 为模板,PCR 删除复制起始位点,将产物回收纯化,用 *PacI*[New England Biolabs(NEB)公司,美国]酶切 pFGC5941-*PacI* 和 PCR 片段,为了防止载体自连,用 pFGC5941-*PacI* 酶切 120 min 后再在体系中加入 1 μL 碱性磷酸酶(NEB,USA)处理 30 min,纯化,4 ℃ 过夜连接,转化 TOP10 感受态细胞,筛选重组载体 pFGC5941-STTM,选择阳性菌落,以 STTM-F、STTM-R 为引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,进行 BLAST 比对。测序验证正确后用液氮速冻法将重组质粒转化到农杆菌 GV3101 中。

2 结果与分析

2.1 NaCl 处理对 zma-miR059 表达的影响

由图 1 可以看出,NaCl 胁迫下玉米叶片、根系中的 zma-miR059 表达量均明显上升。全根 NaCl 处理下,叶片表达量是对照叶的 3.71 倍,根系表达量是对照根系的 3.75 倍。

zma-miR059 在分根 NaCl 处理下的叶片和盐处理侧根系中的表达水平也上升,但没有全根 NaCl 胁迫下的上升明显。分根 NaCl 处理组叶片的表达量比对照叶片上调了 120%,盐处理侧根系的表达量比对照根系上调了 85%,水处理侧根系的表达量与对照根系相当。结果显示,在 NaCl 胁迫下 zma-miR059 的表达量明显上升,与前期高通量测序结果一致,进一步表明 zma-miR059 是一个新的与 NaCl 胁迫相关的 miRNA。

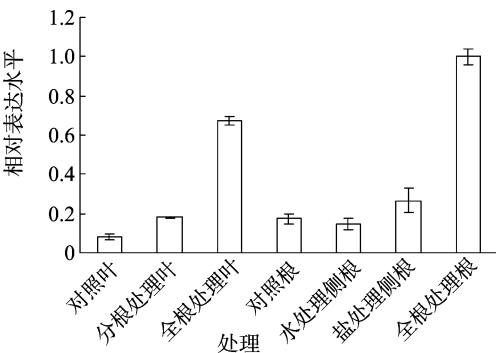


图1 NaCl 处理对玉米幼苗 zma-miR059 表达水平的影响

2.2 NaCl 处理对玉米 SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量的影响

如图 2-A 所示,用 NaCl 处理后,玉米幼苗的叶片和根系中 SOD 活性均有所提高。NaCl 处理对叶片中 SOD 活性的影响比对根系中 SOD 活性的影响更大;SOD 活性在对照、分

根 NaCl 处理和全根 NaCl 处理叶片中呈现出明显的上升趋势,且在全根 NaCl 处理的玉米叶片中 SOD 活性达到最大值;处理组根系中的 SOD 活性虽然也增加了,但没有叶片增加得明显。

NaCl 处理能够在一定水平上影响幼苗的 POD 活性。如图 2-B 所示,NaCl 处理后,叶片中的 POD 活性变化并不明显,其中分根 NaCl 处理呈现出微小的下降趋势。但是全根、分根 NaCl 处理的幼苗根系中 POD 活性均增加。

如图 2-C 所示,与 POD、SOD 的活性变化不同,NaCl 处理后玉米幼苗根系和叶片中的 CAT 活性明显降低,特别是在

全根 NaCl 处理的玉米幼苗中,CAT 活性在其叶片中有明显降低,这与郑世英等的研究结果一致<sup>[16]</sup>。

如图 2-D 所示,NaCl 处理对玉米幼苗的叶片和根系中 MDA 含量影响明显,全根 NaCl 处理的叶片中 MDA 含量是对照叶片中的 4.25 倍,分根 NaCl 处理的叶片中 MDA 含量是对照的 2.06 倍。全根 NaCl 处理的根系中 MDA 含量增加了 2.91 倍,分根处理的根系中 MDA 含量增加了 2.01 倍。经 NaCl 处理后,MDA 含量在玉米幼苗叶片和根系的对照组、分根 NaCl 处理组及全根 NaCl 处理组中均呈现出明显的上升趋势。

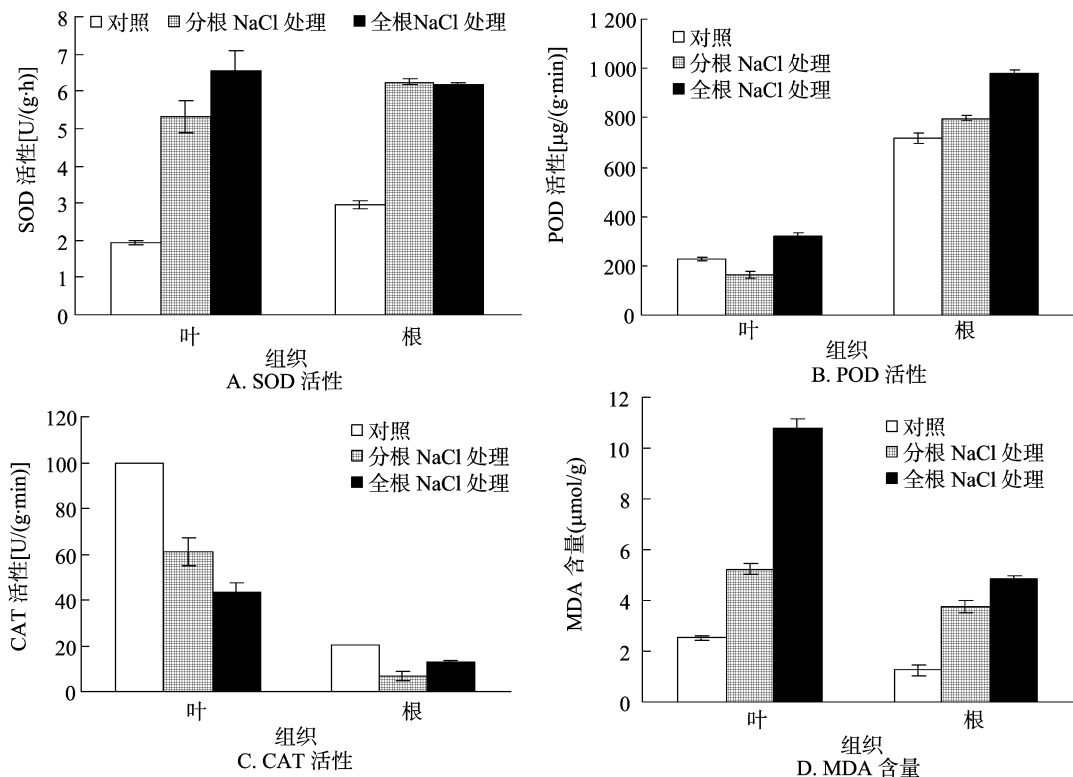


图2 不同 NaCl 处理对玉米幼苗 SOD、POD、CAT 活性及 MDA 含量的影响

### 2.3 zma-miR059-STTM 表达载体的构建

按照第“1.2.5”节中描述的方法进行载体构建,对重组质粒进行菌落 PCR 或酶切鉴定,鉴定正确后通过测序最终确定 STTM 的序列。由图 3 可以看出,1、2、3 泳道检测到的菌落 PCR 片段大小为 134 bp,与预期大小一致,表明连接成功。由

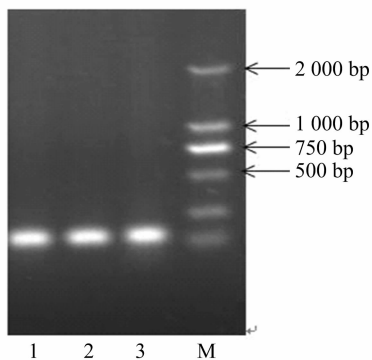


图3 用通用引物 STTM-F 和 STTM-R 对重组质粒 pOT2-STTM 进行菌落 PCR 检测结果

图 4 可以看出,酶切片段为删除 pOT2-STTM 复制起始位点的 PCR 片段,大小为 2 837 bp,与 PCR 片段一样,说明 pFGC5941-STTM 重组质粒连接成功。测序比对后显示序列正确,表明 zma-miR059-STTM 的表达载体构建成功。

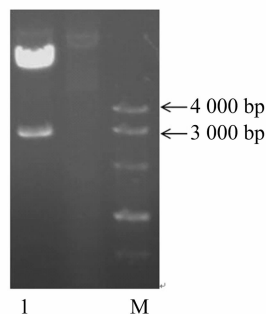


图4 对 pFGC5941-STTM 重组质粒的 PacI 酶切鉴定结果

### 3 讨论与结论

miRNA 以调控靶标的方式在转录后水平参与植物对逆

境胁迫的响应<sup>[17]</sup>。Ding 等研究发现,用盐处理玉米根系时,miR166、miR319、miR395、miR399 等表达水平显著改变<sup>[5]</sup>。本试验结果显示,用 NaCl 处理玉米幼苗时,叶片、根系的 zma-miR059 表达量均升高,表明 zma-miR059 可能是玉米抗盐性相关的 miRNA。此外,分根处理的玉米幼苗叶片和根系中 zma-miR059 的表达量低于全根 NaCl 处理,表明分根处理能够在一定程度上缓解玉米的胁迫情况,从而影响 zma-miR059 的表达量。

植物体内的 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶是检测活性氧代谢的生物标志物<sup>[18-20]</sup>,MDA 在植物受到伤害后产生,植物受外界胁迫越强,MDA 含量越高<sup>[12,21-22]</sup>,因此 MDA 含量及保护酶活性可以用来评判植物对外界胁迫的抵抗能力。全根 NaCl 处理和分根 NaCl 处理后,玉米幼苗叶片、根系中的 SOD、POD 活性均增加,表明 NaCl 胁迫导致植物体内膜脂过氧化、活性氧积累,而 SOD 等保护酶活性的增强可以有效清除活性氧,提高对胁迫的抵御能力。分根 NaCl 处理的玉米幼苗酶活性增加程度明显低于全根 NaCl 处理,表明在 NaCl 浓度相同时,分根 NaCl 处理的膜脂过氧化程度低于全根 NaCl 胁迫,分根处理会在一定程度上缓解植物的膜脂过氧化水平。NaCl 处理后,玉米幼苗的叶片、根系中 MDA 含量明显增加,分根 NaCl 处理的玉米幼苗中 MDA 含量均低于全根 NaCl 处理,因此可见全根 NaCl 处理比分根 NaCl 处理会更大程度地损害植物膜系统。zma-miR059 在根中的表达量变化趋势与 MDA 含量、POD 活性变化趋势基本相同,都是胁迫后上升,且全根 NaCl 处理比分根处理增加幅度更大,进一步说明 zma-miR059 与玉米抵抗盐胁迫相关。

Yan 等构建 miR165/166 的 STTM 载体侵染拟南芥后,出现了植株叶片不规则、矮小、弯曲的表型<sup>[15]</sup>,与 FranCo-Zorrilla 等构建的 TM 载体<sup>[23]</sup>相比,Yan 等构建的突变体沉默效率更高<sup>[15]</sup>。本试验表明,zma-miR059 是 1 个与玉米盐胁迫相关的 miRNA,为了进一步研究 zma-miR059 的作用机制,揭示其功能,笔者构建了 STTM 载体,并进行了农杆菌转化,下一步将获得 STTM-zma-miR059 转基因玉米,期望通过转基因玉米试验进一步明确 zma-miR059 与抗盐性的关系。

#### 参考文献:

- [1] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(30): 324-349.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Jone-Rhoades M W. Conservation and divergence in plant microRNAs[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(1): 3-16.
- [4] Liu H H, Tian X Y, Wu C, et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. *RNA*, 2008, 14(5): 836-843.
- [5] Ding D, Zhong L F, Wang H, et al. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(1): 29-38.

- [6] 向娟, 林鹏, 李兴盛, 等. 过表达番茄 *Sly-miR397* 基因增强拟南芥的抗旱性[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(10): 51-58.
- [7] Gu Z H, Huang C J, Li F F, et al. A versatile system for functional analysis of genes and microRNAs in cotton[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(5): 638-649.
- [8] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51: 463-499.
- [9] Hichem H, Mounir D, Naceur E A. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages [J]. *Industrial Crops and Products*, 2009, 30(1): 144-151.
- [10] Bustos D, Lascano R, Villasuso A L, et al. Reductions in maize root-tip elongation by salt and osmotic stress do not correlate with apoplastic  $O_2^-$  levels[J]. *Annals of Botany*, 2008, 102(4): 551-559.
- [11] Neto A D D A, Prisco J T, Enéas-Filho J, et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56(1): 87-94.
- [12] 田敏, 饶龙兵, 李纪元. 植物细胞中的活性氧及其生理作用[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 235-241.
- [13] Chen C F, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179.
- [14] 高俊凤. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 210-219.
- [15] Yan J, Gu Y, Jia X Y, et al. Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(2): 415-427.
- [16] 郑世英, 商学芳, 王景平. 可见分光光度法测定盐胁迫下玉米幼苗抗氧化酶活性及丙二醛含量[J]. *生物技术通报*, 2010(7): 106-109.
- [17] 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(6): 787-799.
- [18] 付光明, 苏乔, 吴畏, 等. 转 *BADH* 基因玉米的获得及其耐盐性[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 29(3): 344-347.
- [19] 陈博阳, 余彬彬, 钱晓晴, 等. 锌和土霉素胁迫对玉米种子发芽和幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(1): 13-18.
- [20] 王红, 杨镇, 裴文琪, 等. 功能性微生物制剂对镉胁迫下水稻生长及生理特性的影响[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(5): 974-979.
- [21] 张曼, 胡雪丹, 徐锦华, 等. 葫芦砧木种质资源耐冷性评价[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(6): 1390-1395.
- [22] 周军, 武金翠, 杜宝明, 等. 4 种藤本植物的抗旱性比较[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(3): 674-679.
- [23] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(8): 1033-1037.