

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.07.011

冯继鹏, 胡洲, 张曼曼, 等. Cre-miR171 在柑橘响应干旱胁迫中的作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 123-137.

Cre-miR171 在柑橘响应干旱胁迫中的作用

冯继鹏^{1,2}, 胡洲^{1,2}, 张曼曼^{1,2}, 汪小利^{1,2},
易倩^{1,2}, 朱世平^{1,2}, 赵晓春^{1,2}

1. 西南大学 柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712;
2. 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 重庆 401329

摘要: 干旱是影响柑橘生产的一个重要因素。为探究 Cre-miR171 在柑橘耐旱中的作用, 本研究对其前体上游启动子顺式作用元件进行了分析, 研究了其在柑橘组织及生长发育时期的表达特征, 验证了 Cre-miR171 在柑橘中的靶基因, 评价了干旱胁迫下 Cre-miR171 及其靶基因在根不同部位的表达模式, 以及过表达 Cre-miR171 的拟南芥和柑橘的耐旱性。结果表明, Cre-miR171 前体序列启动子区具有与应答及调控逆境胁迫相关的多种响应元件。在根发育的早期高表达, 在侧根发生区的表达量高于根尖。通过生物信息分析及组织表达相关分析鉴定到了 3 个靶基因, *CcLSC6*, *CcLSC22* 和 *CcLSC26*, 并利用烟草瞬时表达试验证实了这 3 个靶基因与 Cre-miR171 的靶向关系。在为期 15 d 的干旱胁迫处理中, Cre-miR171 在侧根区和根尖的表达在处理的第 10 d 出现了明显的相反趋势, 在根尖上调表达, 在侧根区下调表达, 3 个靶基因的表达也呈现相应的变化。过表达 Cre-miR171 的拟南芥和柑橘对干旱的敏感性显著高于对照, 过表达 Cre-miR171 的柑橘主根的伸长生长和侧根的发生受到了抑制。以上结果表明, Cre-miR171 能影响柑橘根的伸长生长和侧根发生, 负调控柑橘的耐旱性。

关键词: Cre-miR171; 干旱胁迫; 根系生长发育; 柑橘

中图分类号: S666; Q344⁺.13 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2023)07-0123-15

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Cre-miR171 on Drought Stress Response in Citrus

FENG Jipeng^{1,2}, HU Zhou^{1,2}, ZHANG Manman^{1,2}, WANG Xiaoli^{1,2},
YI Qian^{1,2}, ZHU Shiping^{1,2}, ZHAO Xiaochun^{1,2}

1. Citrus Research Institute, Southwest University/National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China;
2. Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (CHONGQING) Science City, Chongqing 401329, China

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: 国家重点研发计划专项(2018YFD1000101); 国家自然科学基金项目(31901995); 国家现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-26)。

作者简介: 冯继鹏, 硕士研究生, 主要从事柑橘生物技术研究。

通信作者: 朱世平, 副研究员; 赵晓春, 教授。

Abstract: Drought is an important environmental factor affecting the citrus production. In order to explore the role of Cre-miR171 in citrus drought tolerance, this study analyzed the *cis*-acting elements of its precursor upstream promoter, studied the expression characteristics in different citrus tissues, and growth and development stages, verified the target genes of Cre-miR171, and evaluated the expression patterns of Cre-miR171 and its target genes in different parts of roots under drought stress, as well as the drought tolerance of Cre-miR171 overexpression *Arabidopsis* and citrus plants. The results showed that the promoter region of Cre-miR171 precursor sequence has a variety of elements related to regulation of stress response. Cre-miR171 was highly expressed in the early stage of root development, and the expression level in the lateral root area was higher than that in the root tip. Through bioinformatics analysis and tissue expression correlation analysis, three target genes, *CclSCL6*, *CclSCL22* and *CclSCL26*, were identified. The targeting relationship between these three target genes and Cre-miR171 was confirmed by tobacco transient expression experiments. In a 15-day drought stress treatment, the expression of Cre-miR171 in the lateral root zone and root tip showed a significant opposite trend from the 10th day of treatment with up-regulated expression in the root tip and down-regulated expression in the lateral root zone. The expression of the three target genes also showed corresponding changes. The sensitivity of *Arabidopsis* and citrus plants overexpressing Cre-miR171 to drought was significantly higher than that of the control, and the elongation growth of main roots and the generation of lateral roots in citrus were inhibited. The above results indicated that Cre-miR171 can affect the elongation growth and lateral root formation, and negatively regulate the drought tolerance in citrus.

Key words: Cre-miR171; drought stress; root growth and development; citrus

柑橘是我国最重要的水果,主要种植在南方各省市的山地和丘陵地区.柑橘产区横跨几个气候带,许多柑橘产区的降雨量季节分配不均匀,因此季节性缺水造成的干旱是制约我国许多地区柑橘产业发展的一个主要因素^[1].植物有多种抗旱和耐旱机制应对干旱胁迫,以维持正常的生长和发育.近年的研究发现,一些小分子 RNA 不仅与植物的生长发育密切相关,而且在植物的抗旱中也发挥着至关重要的作用^[2].小分子 RNA 主要有 3 种类型, siRNAs, miRNAs 和 piRNAs, 其中 miRNAs 是目前生物体内存在最广泛的,也是研究最多的一类小 RNA. 这些小 RNA 长度大约在 20~24 个核苷酸,它们通过碱基互补配对与靶基因结合,进而在转录后水平调控基因表达,促使 mRNA 降解或抑制其翻译,起负调控靶基因的作用^[3-4]. miRNA 通过调控靶基因参与植物的生长发育和逆境响应^[5],许多研究报道指出,有多种 miRNA 参与植物的干旱胁迫响应. miR196g 是最早在水稻中被发现的与干旱相关的 miRNA^[6], 豇豆中发现了有近 20 个 miRNA 以不同的方式响应干旱胁迫^[7], 干旱逆境诱导碧桃叶片及根部中 262 和 368 个 miRNA 差异表达^[8], miR168 和 miR396 在拟南芥和烟草中的表达也受干旱胁迫诱导^[9]. 在模式植物拟南芥中, miR171 在干旱、低温、低氧、低磷、低硫等胁迫下表达量都会发生变化^[10]. 豆科植物中 miR171 也响应干旱胁迫^[11]. 在水稻中,过表达 *osa-miR171f* 可以通过调控类黄酮生物合成基因的表达来增强水稻的耐旱性^[12],它通过调节 *SCL6-I* 和 *SCL6-II* 的转录水平在抗旱性中发挥作用. 在苹果中,敲除 *mdm-miR171i* 和过表达它的靶基因 *MsSCL26.1* 均可增强其抗旱性^[13]. 进一步研究发现, *mdm-miR171* 通过调节抗氧化基因表达和抗坏血酸代谢来响应干旱胁迫. 以上研究结果表明, miR171 家族成员响应植物的干旱胁迫. 目前的研究表明, miR171 家族的功能高度保守. 因此可以推测柑橘中的 Cre-miR171 也可能响应干旱胁迫,但柑橘中 Cre-miR171 是否响应干旱胁迫以及调控的靶基因的研究还未见报道.

为明确 Cre-miR171 对柑橘耐旱的作用,本研究通过对 Cre-miR171 在不同柑橘砧木品种、组织及根系不同部位、发育时期的表达特征进行分析,对 Cre-miR171 过表达的柑橘砧木和模式植物拟南芥进行耐旱性及根系形态评价,探究 Cre-miR171 对植物响应干旱胁迫的影响. 并在转基因柑橘中对预测的靶基因

进行表达分析, 为深入研究 Cre-miR171 调控柑橘耐旱性的分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

柑橘砧木品种枳(*Poncirus trifoliata* Raf.)、扁平橘(*Citrus depressa* Hayata, ‘Shiikuwasha’)、红柠檬(*C. limonia* Osbeck, ‘Canton Lemon’)的种子采自国家果树种质柑橘圃(重庆, 北碚)。本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子为本实验室自繁。

DNA 提取试剂盒(植物基因组 DNA 快速提取试剂盒), 反转录试剂盒(Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit), RNA 提取试剂盒(天根 DP504), 限制性内切酶(Thermo Fisher scientific), DNA Marker (Takara), 引物合成和测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.2 试验方法

将枳、扁平橘和红柠檬的种子去除种皮后于(28±1) °C 下保湿催芽。挑选萌芽一致的种子播种于膨胀珍珠岩: 蛭石(体积比 1: 1)的基质中, 在温室(25±1) °C 中培养。选取一月龄左右的不同砧木幼苗, 取其根、茎、叶用于 Cre-miR171 的组织表达分析。分别于枳种子播种后 30 d, 60 d 和 90 d, 取全根用于根的不同发育时期 Cre-miR171 的表达分析。于枳种子播种后 45 d, 取根尖和侧根发生区样品用于 Cre-miR171 在根不同部位的表达分析。于枳种子播种后 60 d, 取茎、叶、侧根发生区以及根尖用于 Cre-miR171 靶基因的表达分析。以上取样各 5 株, 设 5 个生物学重复。

选取长势一致的 1 月龄枳的水培幼苗, 分别用 15% 的 PEG₆₀₀₀ 及 100 μM 的脱落酸(ABA)水溶液进行胁迫处理, 在处理的 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 分别采集全根作为样品, 用于胁迫处理下 Cre-miR171 的表达分析。选取播种后 2 个月、长势一致的盆栽枳幼苗于温室内进行干旱处理, 在干旱处理的 0 d, 5 d, 10 d, 15 d 分别采集根尖区与侧根发生区的组织样品, 用于干旱胁迫下 Cre-miR171 的表达分析。

1.3 生物信息学分析

Cre-miR171 的前体序列来自本实验室前期构建的小 RNA 文库。利用 Ttools 对 Cre-miR171 前体序列与从柑橘基因组数据库下载得到的克里曼丁橘(*C. clementina*)基因组数据进行序列比对, 获得 Cre-miR171 前体序列上游 3 000 bp 启动子序列, 其顺式作用元件通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行预测分析。利用 psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 Update) 在线网站 psRNATarget(2017 update)软件进行小 RNA 靶基因的互补配对, 以 miRNA 的 5' 端为种子序列与参考基因组克里曼丁橘的转录本 3'UTR 区对 Cre-miR171 的靶基因进行预测。靶基因序列从在线网站 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)上获取。

1.4 过表达 Cre-miR171 载体的构建及遗传转化

采用 Primer 3 在线软件设计 1 对 Cre-miR171 前体序列的特异引物, 分别在序列的两端加上 *Swa*I, *Bam*HI 酶切位点(表 1), 以枳的 DNA 为模板, 对 Cre-miR171 进行克隆。用 Solution I 连接酶将 Cre-miR171 前体序列的全长与经 *Swa*I, *Bam*HI 双酶切后的 PGBi 载体进行连接, 转化到大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中, 挑选单克隆送往北京擎科生物科技有限公司进行测序。经测序验证正确的过表达载体转入农杆菌 EHA105 感受态细胞, 用枳上胚轴进行柑橘的遗传转化^[14], 采用花序侵染法进行拟南芥的遗传转化^[15]。

1.5 转基因植株的鉴定与其靶基因的筛选

利用 PCR 方法对 Cre-miR171 的过表达柑橘植株和拟南芥植株进行鉴定。正向引物是 35S 启动子一段序列, 反向引物为 Cre-miR171 前体序列(表 1), 以转基因植株的 DNA 为模板进行扩增。采用茎环法 qRT-PCR 检测各转基因柑橘植株的 Cre-miR171 相对表达量, 选择 Cre-miR171 表达量最高的 3 株进行嫁接扩繁。同时对其靶基因的表达进行定量分析。

表 1 Cre-miR171 的核苷酸序列与引物序列

名称	序列(5'~3')	引物用途
Cre-miR171	UUGAGCCGCGCCAAUAUCACU	核苷酸序列
Pre-miR171-F	ATTTAAATGGTCATTTTTTAAGGCCTTTAGAGCA	miRNA 前体序列扩增
Pre-miR171-R	GGATCCGCTTGAATAACCGGATGC	
35S	CACGCTCGAGTATAAGAGCT	超表达植株的鉴定
RT-miR171	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT- TCGCACTGGATACGACAGTG	反转录引物
qmiR171-F	GCGCGTTGAGCCGCGCCAAT	miR171 定量的上游引物
Reverse primer	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	茎环法通用下游引物
U6-F	GACCAATTCTCGATTTGTGCG	
U6-R	ACAGAGAAGATTAGCATGGCC	miRNA 的内参基因

1.6 烟草瞬时表达载体的构建与转化

构建两类烟草瞬时表达载体进行 Cre-miR171 与其靶基因的互作验证. 一类为 Cre-miR171 前体序列超表达的 GUS 载体, 将 Cre-miR171 的前体序列与线性化的 GUS 载体连接; 另一类为改造过的超表达载体 pMS4 载体, pMS4 载体在 GFP 基因前后有两个酶切位点 XhoI 和 XbaI, 经双酶切之后用于插入 miRNA 靶基因位点. 靶基因位点是通过人工合成的两条寡核苷酸链退火后形成的双链, 分为 *SCcsl6*, *SCcsl22*, *SCcsl26* 以及经过改造的 *MTSCcsl6*, *MTSCcsl22*, *MTSCcsl26* 两类(表 2). 重组后的质粒经北京擎科生物科技有限公司测序验证正确后, 转化至农杆菌 GV3101 菌株的感受态细胞, 在烟草中利用农杆菌介导的侵染共同表达 miRNA 及其靶基因.

表 2 载体构建所用引物

序列名称	引物序列(5'~3')
GUS-miR171	F: GGAGAGGACCTCGAGGGTCATTTTTTAAGGCCTTTAGAGCA R: CGACTGCAGGAATTCGCTTGAATAACCGGATGC
GUS-miR156	F: GGAGAGGACCTCGAGGCAAATTAAGCAAGCCGTTT R: CGACTGCAGGAATTCAGAGACACTGGTGCTCACTTG
<i>SCcsl6</i>	F: TCGAGAGGGATATTGGCGCGGCTCAAT R: CTAGATTGAGCCGCGCCAATATCCCTC
<i>MTSCcsl6</i>	F: TCGAGAGGGATATAAAAAGGGGGCAAT R: CTAGATTGCCCCCTTTTTATATCCCTC
<i>SCcsl22</i>	F: TCGAGAGAGATATTGGCGCGGCTCAAT R: CTAGATTGAGCCGCGCCAATATCTCTC
<i>MTSCcsl22</i>	F: TCGAGAGAGATATGGGGAAAAACAAT R: CTAGATTGTTTTTCCCCCATATCTCTC
<i>SCcsl26</i>	F: TCGAGGGTGATATTGGTTTCGGCTCAAT R: CTAGATTGAGCCGAACCAATATCACCC
<i>MTSCcsl26</i>	F: TCGAGGGTGATATAAAAAGGGGGCAAT R: CTAGATTGCCCCCTTTTTATATCACCC

1.7 Cre-miR171 及其靶基因的荧光定量分析

茎环 qRT-PCR 和 qRT-PCR 分别被用来分析 miRNA 及其靶基因的相对表达量. miRNA 的内参基因为 *U6*, 靶基因的内参基因为柑橘 *CsActin*. 用 Primer5 软件设计 miRNA 的反转录引物和靶基因、内参基因的实时荧光定量 PCR 引物(表 3). qRT-PCR 反应体系为: $2 \times \text{NovoStart}^{\circledR}$ SYBR qPCR SuperMix $5 \mu\text{L}$, 正、反向引物各 $0.2 \mu\text{L}$, RNase Free Water $2.6 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$ (500 ng). 扩增程序为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min , 然后 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s , 共设置 40 个循环. 所有的定量反应都在实时 PCR System (Applied Biosystems 7 500 Fast, Applied Biosystems, USA)上完成. 每个 qRT-PCR 反应重复 3 次. miRNA 及其靶基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行计算^[16].

表 3 qRT-PCR 引物及序列

基因 ID	引物序列(5'~3')
<i>Cclscl6</i>	F: TCTCGCCGATTCTTCAGTTT R: GCATAAGAGAAGCCCACTGC
<i>Cclscl22</i>	F: GTAGAAATCAACACGGCTGAAA R: GACTGTTCTTGATTAGGCGAAC
<i>Cclscl26</i>	F: CAAAGACCCTGAATCCGAAAT R: ATGGTGCAATGAGTCCATGAA
<i>CsActin</i>	F: AGAACTATGAACTGCCTGATGGC R: GCTTGGAGCAAGTGCTGTGATT

1.8 转基因植株的耐旱性评价

选择长势一致的过表达 Cre-miR171 的拟南芥植株进行 26 d 的干旱处理, 并观察其在干旱情况下的表型变化. 在处理 14 d 时取叶片样, 测定 POD 与脯氨酸的含量.

选择长势一致的枳野生型和转基因植株, 剪取相同生长部位的叶片, 放置在干燥的滤纸上, 测定脱水处理 60 min 内的质量变化, 计算相对失水率. 对脱水处理后的叶片进行电导率的测定, 计算处理后叶片的相对电导率.

剪取对照组和 Cre-miR171 表达量最高的过表达枳的枝条, 扦插于蛭石基质中, 待其长出根系后, 评价分析根的生长发育表现.

2 结果与分析

2.1 Cre-miR171 前体上游调控区相关启动子元件分析

利用 PlantCARE 对 Cre-miR171 前体上游启动子顺式作用元件进行预测(图 1), 结果发现: 该小 RNA 的启动子区域除了含有典型的具有转录起始功能的 TATA-box, CAAT-box 核心元件外, 还包括激素和胁迫响应相关元件, 如脱落酸、水杨酸和茉莉酸甲酯响应元件. 此外, 还包含一些光响应、厌氧、昼夜响应等相关元件. 根据以上结果, 推测 Cre-miR171 的表达受多种因素的诱导, 能参与逆境胁迫下的应答及调控.

2.2 Cre-miR171 在柑橘中的表达特征

在枳、扁平橘、红柠檬的幼苗中对 Cre-miR171 的组织表达模式进行分析, 这 3 种砧木的耐旱性明显不同, 其中枳的耐旱性最强^[15]. Cre-miR171 在 3 种不同砧木中表现出相同的组织表达特征, 在根中的表达量相对较低, 在茎中的表达量最高. 同时, Cre-miR171 在耐旱性较强的枳的根和叶中的表达量显著低于其他 2 种耐旱性比较弱的砧木, 与砧木的耐旱性相反, 说明 Cre-miR171 可能参与柑橘对干旱胁迫的响应. Cre-miR171 在枳根生长发育的不同时期的表达也存在明显差异, Cre-miR171 在种子发芽后第 30 d 时表达极低, 在 30~60 d 时急剧上升, 在 60~90 d 时表达量无明显变化, 表明 Cre-miR171 可能与根系的早期发育

相关. Cre-miR171 在根系的表达有一定的组织特异性, 在侧根发生区的表达量明显高于根尖(图 2), 说明 Cre-miR171 对侧根发生和根伸长生长的作用存在差异.

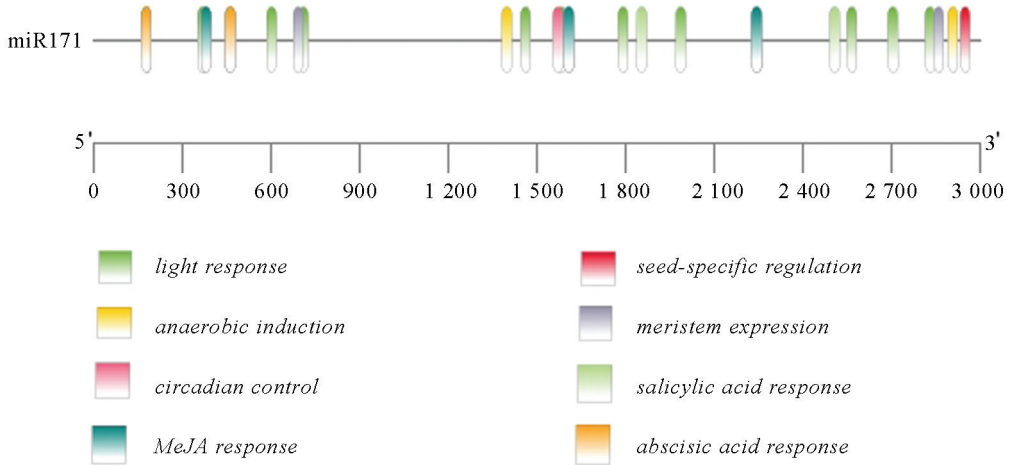
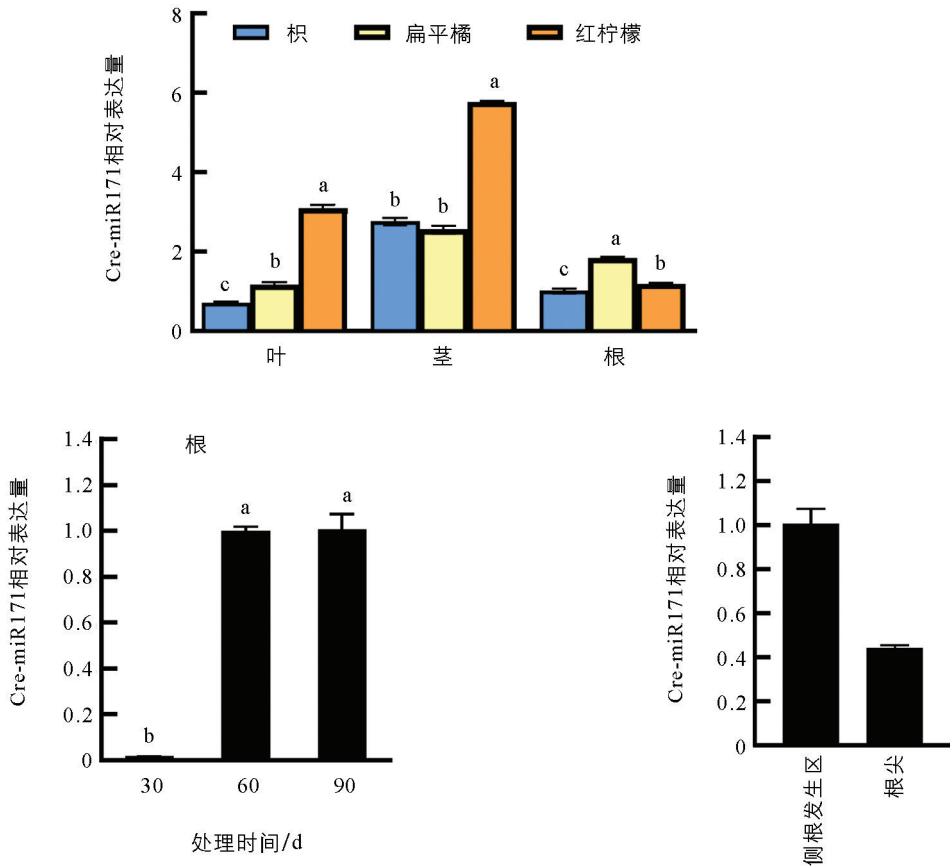


图 1 Cre-miR171 前体上游调控区相关启动子元件



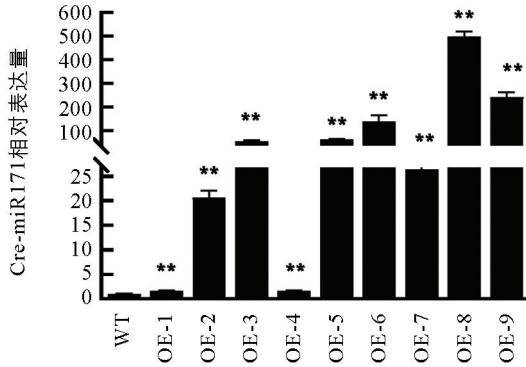
不同小写字母代表差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 2 Cre-miR171 的组织表达

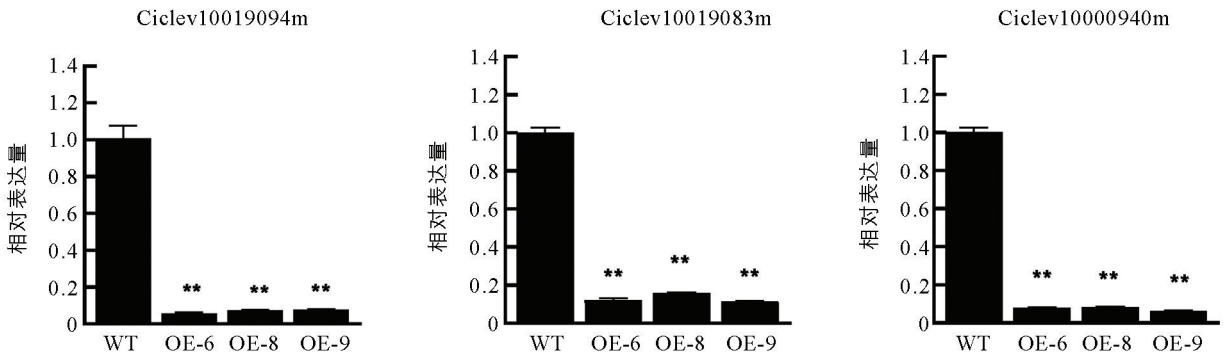
2.3 Cre-miR171 靶基因的预测、鉴定和表达分析

利用 psRNATarget 对 Cre-miR171 的靶基因进行了预测, 通过生物信息学分析去除大量重复基因后, 发现 Cre-miR171 主要靶向 9 个靶基因, 分别为 SCL 家族基因 Ciclev10019094m(SCL6), Ciclev10019083m(SCL22), Ciclev10000940m(SCL26); GRAS 基因 Ciclev10018916m、酰基活化酶相关基因 Ciclev10003943m、蛋白磷酸酶相关基因 Ciclev10001232m、乙烯不敏感基因 Ciclev10000617m 以及 2 个功能未知基因 Ciclev10010118m,

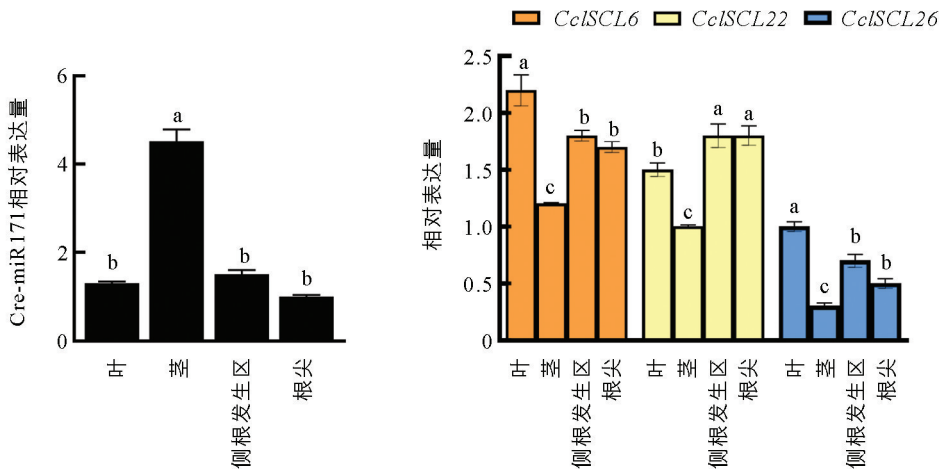
Ciclev10027698m. 在嫁接成活的 9 株超表达 Cre-miR171 的枳植株中选取 Cre-miR171 表达量上调最高的 OE-6, OE-8, OE-9 等 3 个株系对靶基因的表达进行定量分析(图 3a), 发现 Ciclev10019094m, Ciclev10019083m 和 Ciclev10000940m 等 3 个靶基因的表达在超表达植株中受到了明显的抑制, 说明这 3 个靶基因明显受 Cre-miR171 的负调控, 靶向关系较强(图 3b). 基因注释和同源基因比较分析指出, 这 3 个基因是同属于 SCL 家族的同源基因, 在本研究中将这 3 个基因分别命名为 *CelSCL6*, *CelSCL22*, *CelSCL26*. 这 3 个靶基因在枳中的表达表现出相同的组织特异性(图 3c), 和 Cre-miR171 的表达均呈明显负相关, 进一步验证了这 3 个基因是 Cre-miR171 的靶基因, 在功能上有明显的相似性.



a. Cre-miR171 在转基因中的表达分析



b. 靶基因在转基因中的表达分析

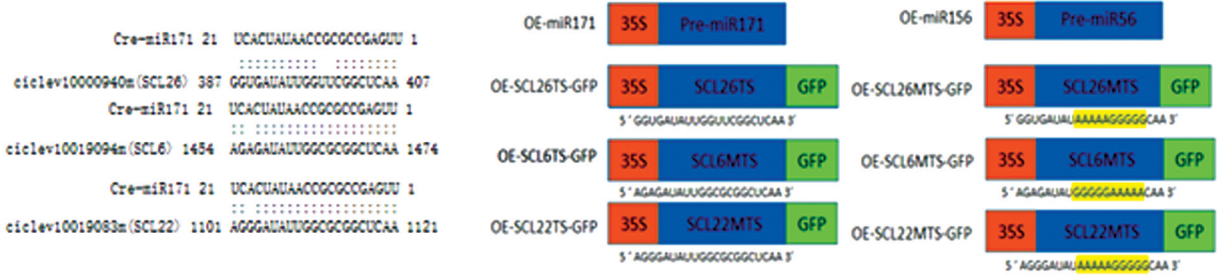


c. Cre-miR171 与靶基因在枳不同部分中的表达分析

“* *”代表相对于 WT 差异有统计学意义($p < 0.01$); 不同小写字母代表差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 3 Cre-miR171 与靶基因的表达分析

利用烟草瞬时表达试验对 Cre-miR171 与 *CclSCL6*, *CclSCL22*, *CclSCL26* 的相互作用进行了验证(图 4)。用农杆菌侵染烟草叶片, 分别共同表达 Cre-miR171、Cre-miRcontrol、携带靶位点的 GFP 基因和携带修饰后的靶位点的 GFP 基因(图 4b)。结果发现, 含有 OE-miR171 和 OE-*SCL26*-GFP, OE-*SCL6*-GFP, OE-*SCL22*-GFP 的农杆菌共同侵染烟草叶片后, 叶片中 GFP 荧光信号均发生了明显的减弱, 而其他组合叶片中的 GFP 荧光信号没有发生明显的改变(图 4d)。因此表明在植物体内, Cre-miR171 能够抑制靶基因 *CclSCL26*, *CclSCL6*, *CclSCL22* 的表达。

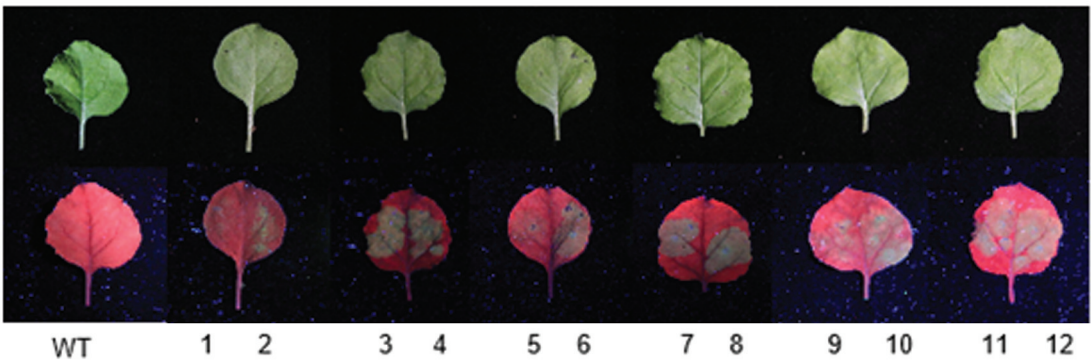


a. Cre-miR171与候选靶基因的预测结合位点

b. 烟草瞬时表达试验的不同载体组合

农杆菌组合	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OE-miR171	-	+	+			+	+			+	+		
OE-miRcontrol	-			+	+			+	+			+	+
OE- <i>SCL26</i> TS-GFP	-	+		+									
OE- <i>SCL26</i> MTS-GFP	-		+		+								
OE- <i>SCL6</i> TS-GFP	-					+		+					
OE- <i>SCL6</i> MTS-GFP	-						+		+				
OE- <i>SCL22</i> TS-GFP	-									+		+	
OE- <i>SCL22</i> MTS-GFP	-										+		+

c. 烟草瞬时表达体系的农杆菌组合注射编号



d. 侵染叶片(1~12)和对照叶片在侵染第3 d时进行日光和紫外光(波长为365 nm)下拍照

图 4 瞬时表达验证 Cre-miR171 靶基因

2.4 非生物胁迫下 Cre-miR171 与靶基因在根中的表达分析

ABA 处理下, Cre-miR171 的表达在根中呈现出逐渐下降的趋势, 但是变化幅度较小; PEG₆₀₀₀ 处理对 Cre-miR171 的表达影响非常显著, 处理过程中, Cre-miR171 在根中的表达呈现出先下降后快速上升再快速下降的趋势, 表现出对胁迫处理的强烈响应, 说明 Cre-miR171 对渗透胁迫比较敏感(图 5a)。为了了解干旱胁迫下 Cre-miR171 在根的不同部位的表达, 对枳幼苗进行了为期 15 d 的自然干旱处理。在

干旱处理的第 10 d 时, 观察到侧根开始发生(图 5c), 根尖数目增加, 而地上部分形态变化不明显. Cre-miR171 的表达明显响应了干旱胁迫, 其在根尖中的表达量高于侧根发生区, 特别在干旱处理 10 d 后更为显著(图 5b), 3 个靶基因的表达也显示出了对干旱胁迫的明显响应, 并在处理 10 d 后出现剧烈的变化(图 5d), 与 Cre-miR171 在这期间的表达明显负相关. 从整个处理时期看, Cre-miR171 与靶基因在干旱胁迫下根的两个部位的表达均没有达到显著的相关性(表 4), 特别在根尖的表达相关性更弱. 但在处理的第 5 d 后, Cre-miR171 与其靶基因在根的两个部位的表达趋势均转变为明显的负相关(表 5), 特别在 10 d 后均表现出强烈的变化, 说明 Cre-miR171 的表达受干旱胁迫的诱导, 并在响应胁迫后对靶基因产生了较强的调控作用. 另外, Cre-miR171 在根部两个部位的表达在处理的第 10 d 后出现相反的趋势, 3 个靶基因的表达也随之发生相应的变化, 说明 Cre-miR171 在干旱胁迫下能抑制根的伸长生长, 促进侧根的发生.

表 4 干旱胁迫下 Cre-miR171 与其靶基因在根中表达水平的相关性分析

基因	<i>CclCcl6</i>	<i>CclCcl22</i>	<i>CclCcl26</i>
相关系数(侧根发生区)	-0.484	-0.361	-0.531
相关系数(根尖)	0.047	0.04	0.071

表 5 干旱胁迫 5~15 d 内 Cre-miR171 与其靶基因在根中表达水平的相关性分析

基因	<i>CclCcl6</i>	<i>CclCcl22</i>	<i>CclCcl26</i>
相关系数(侧根发生区)	-0.823**	-0.824**	-0.828**
相关系数(根尖)	-0.523	-0.547	-0.528

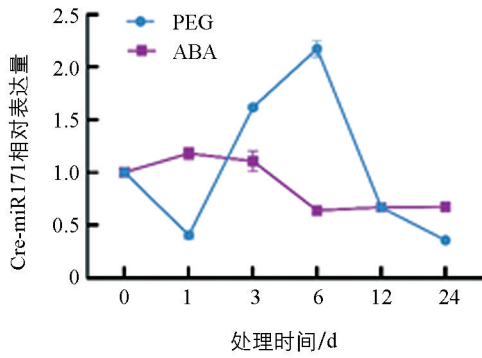
注: ** 表示差异有统计学意义($p < 0.01$).

2.5 表达外源 Cre-miR171 拟南芥的耐旱性评价

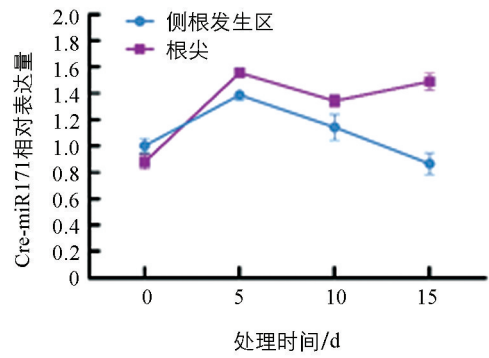
miR171 在植物中较为保守^[17], 序列比对显示, Cre-miR171 与拟南芥 miR171 家族成员之间只有 2 个核苷酸的差异(图 6a). 对过表达 Cre-miR171 3 周龄的拟南芥进行 26 d 的干旱处理, 结果显示, 在干旱 14 d 内, 野生型拟南芥的生长状况良好, 叶片色泽鲜绿, 而转基因植株的叶片颜色则明显加深; 在干旱 21 d 时转基因拟南芥叶片的边缘枯黄, 野生型的拟南芥叶片的颜色也开始加深, 但转基因拟南芥的叶片颜色更深, 而且转基因拟南芥植株的生长已受到了极大的抑制, 植株明显矮小; 干旱 26 d 时转基因拟南芥的叶片因脱水而导致叶片大面积萎蔫(图 6c), 干旱胁迫处理对转基因株系伤害程度明显高于野生型株系. 以上结果说明, 过表达 Cre-miR171 使拟南芥对干旱逆境的敏感性显著增加. 干旱处理 14 d 时转基因植株的过氧化物酶含量高于野生型植株, 其脯氨酸含量也显著高于野生型(图 6d), 也说明了转基因拟南芥更早地响应干旱胁迫.

2.6 超表达 Cre-miR171 枳的耐旱性评价

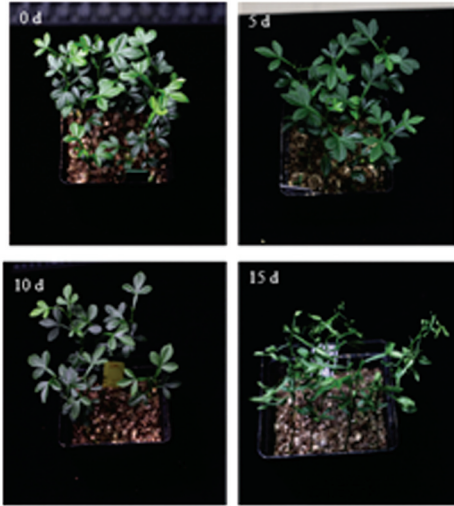
对扩繁成活的转基因植株 OE-6, OE-8, OE-9 的叶片进行脱水处理, 在处理 30 min 到 60 min 时转基因株系叶片的相对失水率均显著高于野生型. 转基因枳的叶片在脱水处理后的电导率高于野生型(图 7), 说明转基因枳膜系统被干旱损伤的程度高于野生型, 超表达 Cre-miR171 明显降低了枳的耐旱能力.



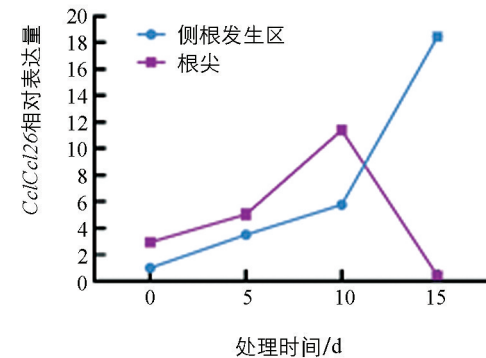
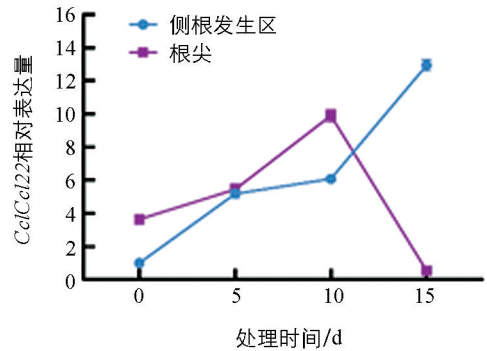
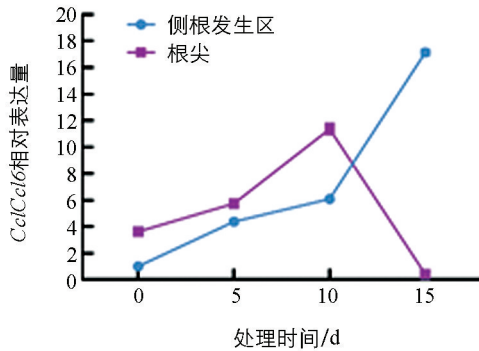
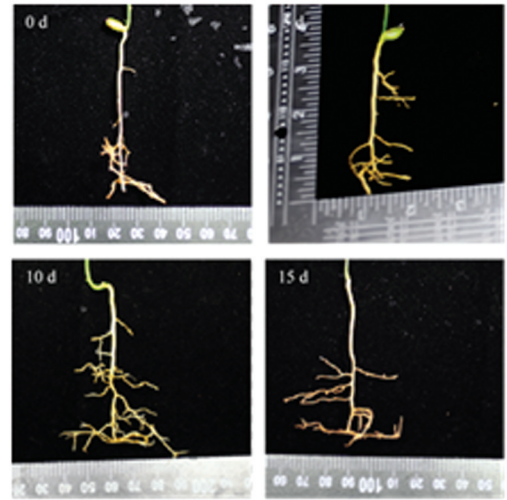
a. ABA、PEG处理下cRE-MiR171的表达量



b. 自然干旱胁迫下侧根发生区和根尖中Cre-miR171的表达量

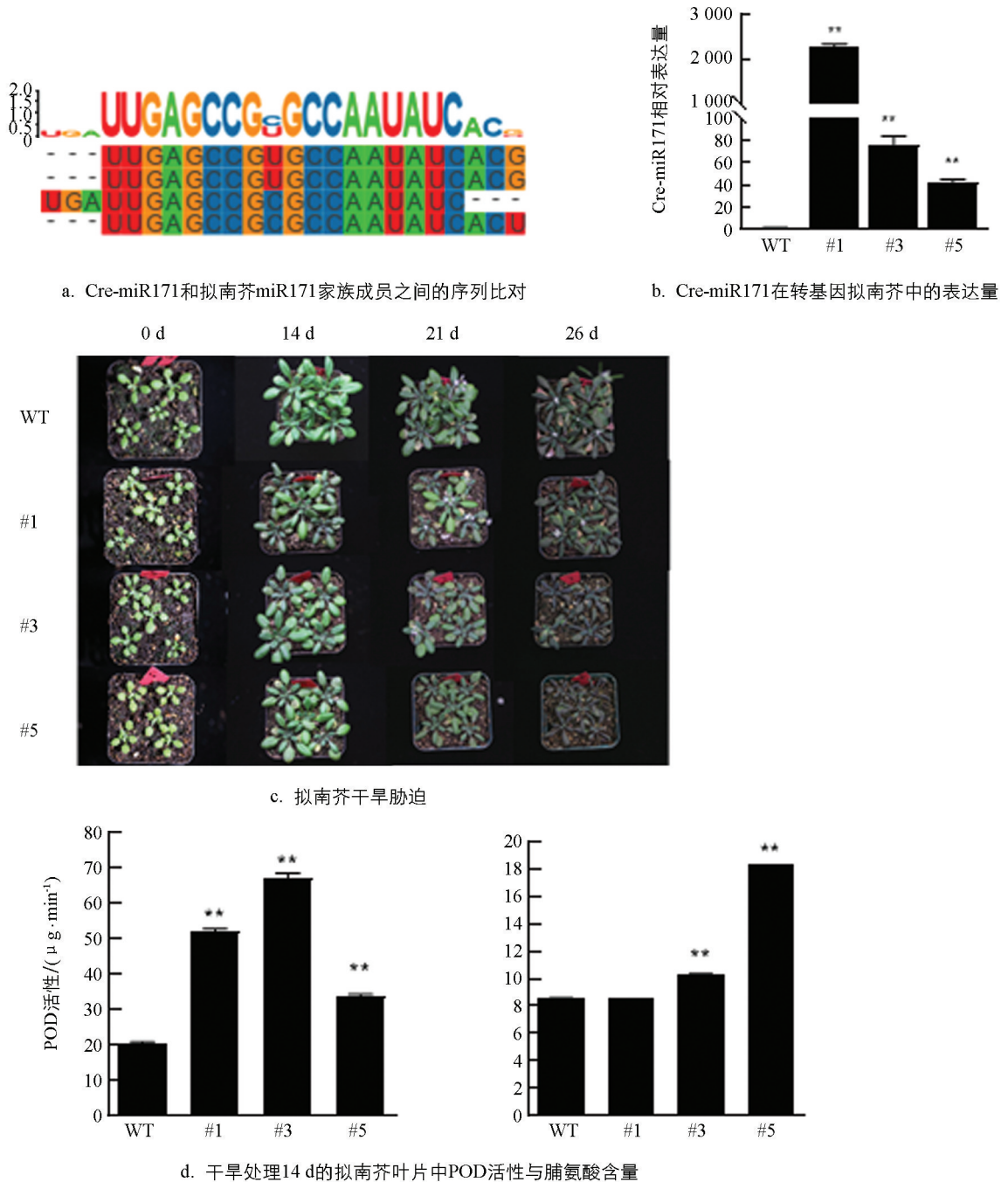


c. 自然干旱胁迫下叶与根



d. 自然干旱胁迫下侧根发生区和根尖中的靶基因的表达量

图 5 非生物胁迫下 Cre-miR171 与其靶基因在根中的表达



#1, #3, #5 为不同转基因拟南芥株系; * * 代表相对于 WT 差异有统计学意义 ($p < 0.01$)。

图 6 外源表达 Cre-miR171 的拟南芥

对扦插生根的对照组和超表达 Cre-miR171 的枳植株的根系进行形态观测(图 8a), 发现转基因植株的侧根比对照组的少, 根系也明显短, 说明 Cre-miR171 影响了枳根系的生长发育, 超表达 Cre-miR171 抑制了枳的主根伸长生长和侧根发生. 对扦插 90 d 的转基因枳进行表达定量分析, 结果显示, Cre-miR171 在转基因枳的叶片与根中的表达量都显著上调(图 8b), 其靶基因 *CclSCL26*, *CclSCL6*, *CclSCL22* 的表达量受到抑制(图 8c), 说明 Cre-miR171 可能通过负调控其靶基因 *CclSCL26*, *CclSCL6*, *CclSCL22* 的表达来抑制主根的伸长生长和侧根的发生.

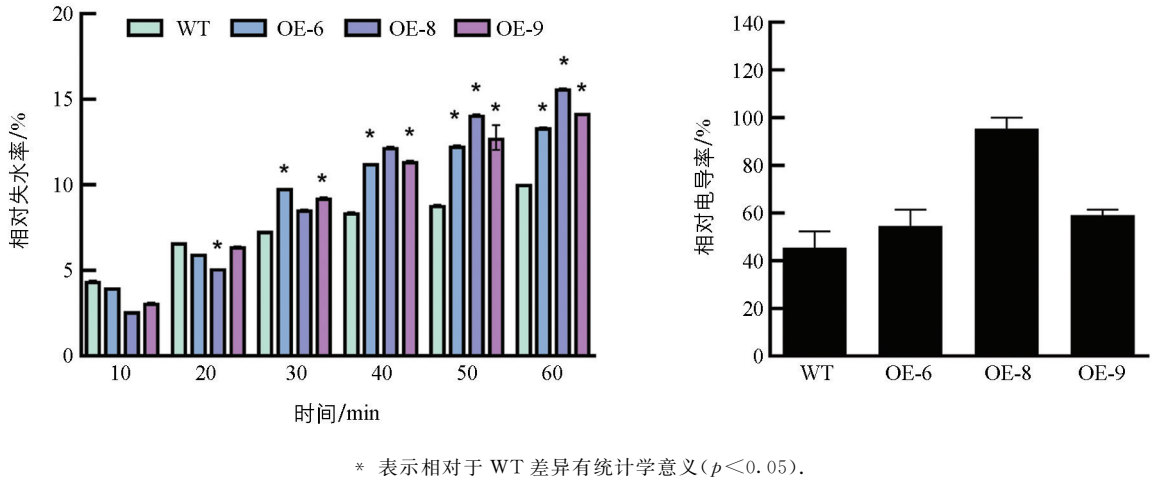


图 7 超表达 Cre-miR171 枳的相对失水率与相对电导率

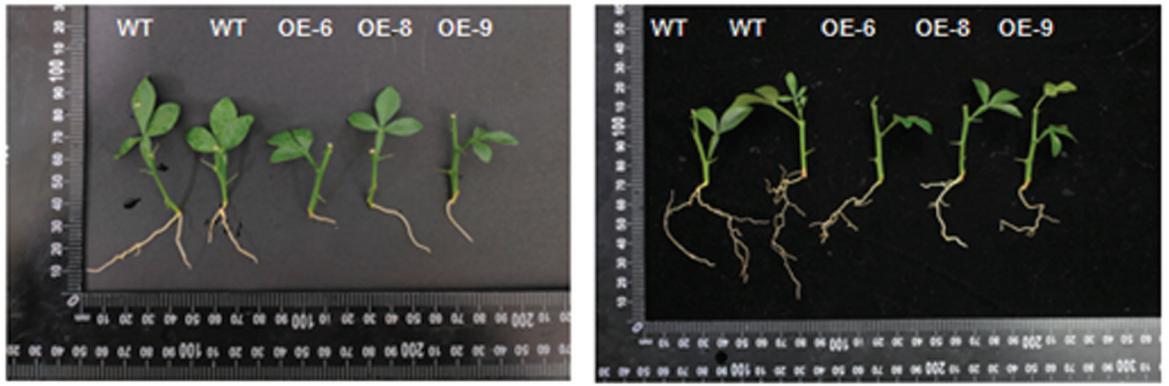
3 结论与讨论

在植物中, miR171 参与调节植物基本的发育和代谢过程^[18-19]. 在模式植物拟南芥中, miR171 通过调控其靶基因 *AtSCL6-II*, *AtSCL6-III* 和 *AtSCL6-IV* 的表达影响茎尖分生组织^[20-21]. 过表达 miR171 前体可以抑制腋芽形成和花芽数量, 从而改变拟南芥茎的结构^[22]. 拟南芥幼苗在高盐、低温和干旱胁迫下 miR171 的表达量都会上调^[9], 推测 miR171 参与了拟南芥非生物胁迫的调控. 番茄中 miR171 和 *SCL6* 通过调节激素信号去调控番茄的生长发育^[23]. 甘蔗中 miR171 响应盐胁迫^[24].

Cre-miR171 启动子区有光信号、脱落酸、水杨酸、茉莉酸甲酯等激素和胁迫响应元件, 同时 miR171 被证实响应光信号^[25]、茉莉酸甲酯^[26]、水杨酸、脱落酸^[27] 诱导, 表明 Cre-miR171 可能受光信号、茉莉酸甲酯、水杨酸、脱落酸等多条信号通路的影响, 推测 Cre-miR171 可能参与逆境胁迫下的应答及调控. 表达 Cre-miR171 的拟南芥对干旱胁迫更敏感, 脱水处理对过表达 Cre-miR171 枳叶片的膜系统的伤害显著高于对照, 说明过表达 Cre-miR171 的枳转基因植株的耐旱能力降低. 这与在苹果中的研究结果相似^[13], 表明 Cre-miR171 对柑橘的耐旱性有负调控的作用.

有研究表明 miR171 在根的发育和生长中发挥重要作用, miR171 参与苹果^[28] 和葡萄^[29] 的不定根形成, miR171 还影响了水稻的根系发育^[30], 同时 miR171 被证实可以影响蒺藜苜蓿的侧根密度^[31]. 本研究中, Cre-miR171 在柑橘根发育的早期高表达, 而且在侧根发生区的表达量高于根尖, 表明 Cre-miR171 对柑橘根系的发育及侧根的形成有重要影响.

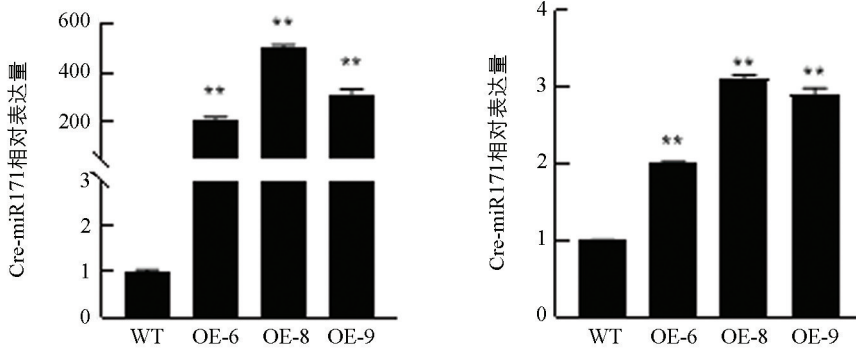
本研究中预测并验证的 3 个 Cre-miR171 的靶基因 (*CclSCL6*, *CclSCL22*, *CclSCL26*) 是植物中特有的转录因子, 其功能具有多样性, 参与植物的生长发育^[32]、信号转导、生物胁迫和非生物胁迫相关的应答过程^[33]. Cre-miR171 在响应干旱胁迫后在侧根发生区下调表达, 在根尖上调表达, 趋势相反, 3 个靶基因的表达也随之发生相应的显著变化, 说明在干旱胁迫下, Cre-miR171 能通过对靶基因表达的调控抑制根的伸长生长, 促进侧根的发生. 可以推测, Cre-miR171 可能调控柑橘根系在干旱胁迫下的可塑性.



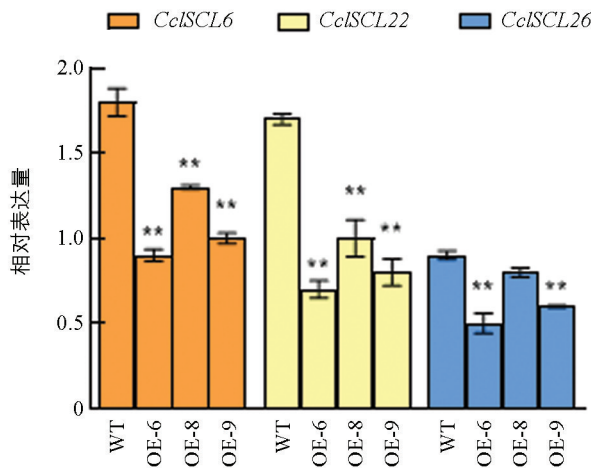
扦插60 d

扦插90 d

a. 超表达Cre-miR171枳的根系形态



b. Cre-miR171在转基因枳叶与根中的表达量



c. 靶基因在转基因枳根中表达量

** 表示相对于 WT 差异有统计学意义 ($p < 0.01$).

图 8 Cre-miR171 及其靶基因在转基因枳的根中的表达

参考文献:

[1] CHEN R Z, DENG Y W, DING Y L, et al. Rice Functional Genomics: Decades' Efforts and Roads Ahead [J]. Science China Life Sciences, 2022, 65(1): 33-92.

[2] WEI L Y, ZHANG D F, XIANG F, et al. Differentially Expressed miRNAs Potentially Involved in the Regulation of Defense Mechanism to Drought Stress in Maize Seedlings [J]. International Journal of Plant Sciences, 2009, 170(8):

979-989.

- [3] BARTEL D. microRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [4] CHEN X M. microRNA Biogenesis and Function in Plants [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5923-5931.
- [5] 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.
- [6] ZHAO B T, LIANG R Q, GE L F, et al. Identification of Drought-Induced microRNAs in Rice [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354(2): 585-590.
- [7] BARRERA-FIGUEROA B E, GAO L, DIOP N N, et al. Identification and Comparative Analysis of Drought-Associated microRNAs in Two Cowpea Genotypes [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 127.
- [8] ELDEM V, ÇELIKKOL AKÇAY U, OZHUNER E, et al. Genome-Wide Identification of miRNAs Responsive to Drought in Peach (*Prunus Persica*) by High-Throughput Deep Sequencing [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50298.
- [9] LIU H H, TIAN X, LI Y J, et al. Microarray-Based Analysis of Stress-Regulated microRNAs in *Arabidopsis Thaliana* [J]. *RNA*, 2008, 14(5): 836-843.
- [10] 文晓鹏, 杨鵬. 植物 miRNA 在应答非生物胁迫上的调控作用 [J]. *山地农业生物学报*, 2014, 33(6): 1-13, 37.
- [11] ZHOU Z S, HUANG S Q, YANG Z M. Bioinformatic Identification and Expression Analysis of New microRNAs from *Medicago Truncatula* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(3): 538-542.
- [12] UM T, CHOI J, PARK T, et al. Rice microRNA171f/SCL6 Module Enhances Drought Tolerance by Regulation of Flavonoid Biosynthesis Genes [J]. *Plant Direct*, 2022, 6(1): e374.
- [13] WANG Y T, FENG C, ZHAI Z F, et al. The Apple microR171i-SCARECROW-LIKE PROTEINS26.1 Module Enhances Drought Stress Tolerance by Integrating Ascorbic Acid Metabolism [J]. *Plant Physiology*, 2020, 184(1): 194-211.
- [14] 靖艳玲. 早实枳 FT 类似基因的结构分析和功能验证 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [15] 罗国涛. 柑橘砧木根系发育相关基因的发掘及功能鉴定 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [16] 胡洲. 柑橘砧穗互作中 microRNA 对果实糖酸含量的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2022.
- [17] GU W J, WANG X F, ZHAI C Y, et al. Selection on Synonymous Sites for Increased Accessibility around miRNA Binding Sites in Plants [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(10): 3037-3044.
- [18] ASHA S, NISHA J, SONIYA E V. In Silico Characterisation and Phylogenetic Analysis of Two Evolutionarily Conserved miRNAs (miR166 and miR171) from Black Pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(3): 707-718.
- [19] ZHANG B H, PAN X P, CANNON C H, et al. Conservation and Divergence of Plant microRNA Genes [J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(2): 243-259.
- [20] LLAVE C, XIE Z X, KASSCHAU K D, et al. Cleavage of SCARECROW-LIKE mRNA Targets Directed by a Class of *Arabidopsis* miRNA [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [21] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. microRNAs in Plants [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(13): 1616-1626.
- [22] SCHULZE S, SCHÄFER B N, PARIZOTTO E A, et al. LOST MERISTEMS Genes Regulate Cell Differentiation of Central Zone Descendants in *Arabidopsis* Shoot Meristems [J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(4): 668-678.

- [23] HUANG W, PENG S Y, XIAN Z Q, et al. Overexpression of a Tomato miR171 Target Gene SlGRAS24 Impacts Multiple Agronomical Traits via Regulating Gibberellin and Auxin Homeostasis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(4): 472-488.
- [24] STERNES P R, MOYLE R L. Deep Sequencing Reveals Divergent Expression Patterns within the Small RNA Transcriptomes of Cultured and Vegetative Tissues of Sugarcane [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(4): 931-951.
- [25] 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 QPCR [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(10): 943-957.
- [26] 姚德恒. 迷迭香细胞培养与 MeJA 对其重要次生代谢物的影响及分子机制 [D]. 福州: 福建农林大学, 2021.
- [27] 李宏宇. 百合体胚发生相关基因 MIR171 的克隆及其启动子功能分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [28] LI K, LIU Z, XING L B, et al. MiRNAs Associated with Auxin Signaling, Stress Response, and Cellular Activities Mediate Adventitious Root Formation in Apple Rootstocks [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 66-81.
- [29] CHEN Q J, DENG B H, GAO J E, et al. A MiRNA-Encoded Small Peptide, Vvi-miPEP171d1, Regulates Adventitious Root Formation [J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 656-670.
- [30] CHO J, PASZKOWSKI J. Regulation of Rice Root Development by a Retrotransposon Acting as a microRNA Sponge [J]. *eLife*, 2017, 6: 30038.
- [31] LAURESSERGUES D, COUZIGOU J M, CLEMENTE H S, et al. Primary Transcripts of microRNAs Encode Regulatory Peptides [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 90-93.
- [32] DI LAURENZIO L, WYSOCKA-DILLER J, MALAMY J E, et al. The SCARECROW Gene Regulates an Asymmetric Cell Division that is Essential for Generating the Radial Organization of the *Arabidopsis* Root [J]. *Cell*, 1996, 86(3): 423-433.
- [33] HWANG E W, SHIN S J, YU B K, et al. miR171 Family Members are Involved in Drought Response in *Solanum tuberosum* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2011, 54(1): 43-48.

责任编辑 王新娟