

引用格式:

吕思晓, 肖敏敏, 陈信波. OsmiR530 正调控水稻的耐旱和耐盐性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(1): 43–51.

LYU S X, XIAO M M, CHEN X B. OsmiR530 positively regulates the drought and salt tolerance of rice [J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(1): 43–51.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## OsmiR530 正调控水稻的耐旱和耐盐性

吕思晓, 肖敏敏, 陈信波\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 以粳稻品种日本晴(CK)和农杆菌介导转化的 OsmiR530-OE 转基因水稻为材料进行耐旱和耐盐性相关功能的鉴定。结果表明:OsmiR530 有 2 种成熟的序列形式 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p,其表达量在 OsmiR530-OE 转基因植株均有明显增加;靶基因表达量预测分析发现, OsmiR530-5p 的靶基因 *OsTAP46*、*OsC3HC4*、*OsPWI* 和 *OsEI* 等在 OsmiR530-OE 转基因植株中的表达都有一定程度的下调;在干旱、盐胁迫条件下, OsmiR530 能提高种子的发芽率、根长和苗高以及萌芽期幼苗对干旱胁迫和盐胁迫的耐受性;检测干旱处理植株的 SOD、POD 和 CAT 活性,发现 OsmiR530-OE 转基因水稻的 SOD、POD 和 CAT 活性增长显著;对成熟期水稻植株的农艺性状进行统计分析,发现过表达 OsmiR530 水稻植株的剑叶的叶表面积、千粒质量以及结实率显著降低。推测 OsmiR530 可以调控水稻对盐胁迫、干旱胁迫的耐受性。

**关键词:** 水稻; miR530; 耐旱性; 耐盐性

中图分类号: S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)01-0043-09

## OsmiR530 positively regulates the drought and salt tolerance of rice

LYU Sixiao, XIAO Minmin, CHEN Xinbo\*

(College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** Drought and salt tolerance related functions were identified on the transgenic OsmiR530-OE rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and Nipponbare. The results showed that two mature sequences of OsmiR530, OsmiR530-5P and OsmiR530-3P existed in the plant, and the expression of OsmiR530 was significantly increased in the OsmiR530-OE transgenic plants. The expression levels of predicted target genes *OsTAP46*, *OsC3HC4*, *OsPWI* and *OsEI* of OsmiR530-5p were down-regulated in OsmiR530-OE transgenic plants. Under drought and salt stress, OsmiR530 gene could increase germination rate, root length, seedling height and seedling tolerance to drought and salt stress. SOD, POD and CAT activities of drought-treated plants were detected, and it was found that SOD, POD and CAT activities of OsmiR530-OE transgenic rice increased significantly. The statistical analysis of agronomic traits of rice plants at maturity showed that the leaf surface area, thousand grain weight and seed setting rate of sword leaf of rice plants overexpressing OsmiR530 were significantly reduced. Most likely, OsmiR530 could regulate the tolerance of rice to salt and drought stress.

**Keywords:** rice; miR530; drought tolerance; salt tolerance

干旱胁迫是世界粮食生产遭受的严重威胁之一,会对作物的品质与产量造成严重的危害。在干

旱胁迫条件下,植物体内相关 miRNAs 的表达会发生变化并对其靶基因起到调控作用,从而对于旱环

收稿日期: 2023-05-30

修回日期: 2024-01-26

基金项目: 湖南农业大学“双一流”学科建设项目(SYL2019019)

作者简介: 吕思晓(1999—),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究,2461010914@qq.com; \*通信作者,陈信波,博士,教授,主要从事植物分子生物学研究,chenxinbo@hunau.edu.cn

境进行响应。盐胁迫是植物面临的一个重要的非生物胁迫因素,会对植物的光合作用、信号转导、蛋白质合成和降解过程造成影响。有研究<sup>[1]</sup>表明, microRNA 在植物应答外界逆境胁迫过程中发挥着重要作用。微阵列表达试验<sup>[2]</sup>发现,水稻 miR393 和 miR169 在受到干旱胁迫时表达量上调。水稻中的 miR393 在干旱胁迫下表现上调<sup>[3-4]</sup>。GAO 等<sup>[5]</sup>报道, miR396c 的表达水平在盐胁迫下下调,并对盐碱胁迫响应可能起重要作用。植物 miRNAs 也可通过调节植物激素信号通路来调控植物对盐胁迫的抗性或耐受性。miR319 和 miR528 是 2 个盐胁迫诱导的 miRNAs, 可以通过下调其靶基因, 增强植物对盐胁迫的耐受性<sup>[6-7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>发现, miR528 过表达转基因株系对盐胁迫更加敏感,表现出根系的相对伸长量受到严重抑制,叶绿素和可溶性蛋白含量降低,叶片中 MDA 和脯氨酸含量显著升高,根系和叶片中抗氧化酶活性出现不同程度的变化。

本研究中,对 OsmiR530 进行靶基因预测分析,对通过农杆菌转化法获得的过表达转基因水稻进行耐逆相关功能鉴定,旨在探究 OsmiRNA530 在水稻逆境胁迫中的调控作用,为未来研究 miRNA 功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料:粳稻品种日本晴、农杆菌介导转化的 OsmiR530-OE 转基因水稻材料由作物基因工程湖南省重点实验室提供。

主要试剂:植物培养基所需的组成成分购自上海国药有限公司和北京鼎国昌盛生物技术有限公司;潮霉素 B(Hyg)购于 Calbiochem;总 RNA 提取 Trizol 试剂、逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 和 DNaseI 等购自 Thermo Scientific;2×TSINGKE Master Mix 购自湖南擎科生物技术有限公司;QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit 试剂盒购自 Qiagen。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 OsmiR530 的靶基因预测

从 miRBase(<http://www.mirbase.org/>)下载 OsmiR530 的成熟序列 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p,通过在线

microRNA 靶基因预测网站 psRNATarget(<http://plant-grn.noble.org/psRNATarget/>)对 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p 的靶基因进行预测分析,筛选出可能的 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p 的靶基因,得到各靶基因的 cDNA 序列。根据从水稻数据库 RGAP 和 ExPASy 上得到的 OsmiR530 靶基因的相关序列信息,对靶基因所编码蛋白质的氨基酸数、等电点和相对分子质量等信息进行预测分析。通过 TargerP 1.1 server 对 OsmiR530 的靶基因进行亚细胞定位预测。

#### 1.2.2 引物设计

根据 CHEN 等<sup>[9]</sup>和 VARKONYI-GASIC 等<sup>[10]</sup>所提出的 stem-loopRTprimer 的引物设计方法设计用于检测 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p 表达量的引物;根据获得的 cDNA,运用 Primer Premier 5 设计检测 OsmiR530 相关靶基因表达量的引物。所有的引物交由湖南擎科生物技术有限公司合成,具体信息见表 1 和表 2。

表 1 靶基因检测所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>Actin</i> -F	CTTCAACACCCCTGCTATG	358
<i>Actin</i> -R	TCCATCAGGAAGCTCGTAG	
<i>OsC3HC4</i> -F	CAAGTAGTAGCCGCACAG	251
<i>OsC3HC4</i> -R	CAAAGATGAAAGTAGTCCCT	
<i>OsPWI</i> -R	TGGTCTGATTGGCTCTGG	274
<i>OsPWI</i> -R	ATCCCTTTGGTTCGTTCT	
<i>OsDUF594</i> -F	TCCCTGGTGTCTCAAGT	428
<i>OsDUF594</i> -R	ATCGGTGTCAACATTGGTAT	
<i>OsE1</i> -F	GAGCTGCGGAGCGAGGTGTA	119
<i>OsE1</i> -R	GCGGTGTTGGCGAAGATG	
<i>OsTAP46</i> -F	GGAAATGACTGAAAGGGTA	370
<i>OsTAP46</i> -R	GCATAGAGCCAATGAGATAG	

表 2 miRNA 检测所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Hyg</i> -F	ATGTTGGCGACCTCGTATT
<i>Hyg</i> -R	ACTGGCAAACCTGTGATGGAC
<i>U6</i> -F	CGATAAAATTGGAACGATACAGA
<i>U6</i> -R	ATTTGGACCATTTCTCGAATTTGT
OsmiR530-5p-F	GCCTGCATTTGCACCT
OsmiR530-5p-R	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
OsmiR530-3p-F	GCGAAAGGTGCAGAGG
OsmiR530-3p-R	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC

### 1.2.3 T0 代和 T1 代水稻转化植株的 DNA 水平检测和转录水平检测

以通过 CTAB 法提取的转基因水稻幼苗叶片总 DNA 为模板, PCR 法扩增 *Hyg* 基因片段, 以日本晴水稻叶片提取的总 DNA 为阴性对照, 对转化植株进行 DNA 水平的检测。

以 T0 代 DNA 水平检测为阳性的 OsmiR530-OE 转基因水稻植株的 RNA 为模板, 用表 2 所设计的特异反转引物逆转录 OsmiR530-3p 和 OsmiR530-5p, 以 *U6* 为内参基因, 利用 qRT-PCR 检测 T0 代水稻转化植株中 OsmiR530 的表达水平。以 T1 代 OsmiR530-OE 转基因水稻植株的 RNA 为模板, 以 *U6* 为内参基因, 通过半定量 RT-PCR 检测 OsmiR530 的表达水平。将 *Actin* 作为靶基因的内参基因, 用试剂盒中的通用引物逆转录靶基因的 cDNA, 对所预测的靶基因进行半定量 RT-PCR 分析。

### 1.2.4 转基因水稻种子的干旱和盐胁迫处理

随机选择纯合子的 OsmiR530-OE 转基因水稻种子以及日本晴水稻种子, 剥壳消毒后, 将日本晴种子接种于甘露醇浓度分别为 0、50、100、150、200 mmol/L 的 1/2MS 培养基中, OsmiR530-OE 转基因水稻种子接种于添加以上浓度甘露醇且含有 50 mg/L 潮霉素 B 的 1/2MS 培养基上, 每盘 25 颗, 3 次重复。7 d 后统计发芽率, 10 d 后统计根长与苗高。

随机选择纯合子的 OsmiR530-OE 转基因水稻种子以及日本晴水稻种子, 剥壳消毒后, 将日本晴种子接种于 NaCl 浓度分别为 0、50、100、150、200 mmol/L 的 1/2MS 培养基中。OsmiR530-OE 转基因水稻种子接种于添加以上浓度 NaCl 且含有 50 mg/L 潮霉素 B 的 1/2MS 培养基上, 每盘 25 颗, 3 次重复。7 d 后统计发芽率, 10 d 后统计根长与苗高。

### 1.2.5 转基因水稻植株幼苗的自然干旱和盐胁迫处理

将 OsmiR530-OE 转基因水稻种子接种于添加质量浓度为 50 mg/L 潮霉素 B 的 1/2MS 培养基上萌发, CK 在正常 1/2MS 培养基上萌发。7 d 后, 选取生长状态良好且一致的 CK 和 OsmiR530-OE 转基因株系幼苗移栽至营养土中, 每个材料 16 株。将移栽好的植株置于人工气候箱中培养, 培养条件为 14 h 光照, 光照度 7000 lx, 28 °C, 10 h 黑暗。待

幼苗生长至 21 d 时断水进行干旱处理, 直至土壤含水量低于 20% 时进行复水处理。拍照观察复水前、后幼苗的生长状况。3 次重复。

按照上述方法将转基因种子进行发芽并将幼苗培育至 21 d 时, 用浓度为 200 mmol/L 的 NaCl 溶液代替水浇灌培养 7 d 左右, 再恢复培养 3~5 d。其间拍照观察处理前、后幼苗的生长状况。3 次重复。

### 1.2.6 转基因水稻植株的干旱逆境处理

孕穗期将大田中生长状态基本一致的日本晴水稻植株和 OsmiR530-OE 转基因水稻植株移栽到花盆中, 并将移出的植株置于与大田类似的环境中继续培养 3~5 d, 恢复植株受损的根系。恢复培养后, 倒出花盆中的积水, 停止灌溉, 用土壤水分测定仪测定每个花盆中的土壤, 水分含量一致且均低于 20% 后开始干旱胁迫试验。测定处理前和干旱处理 3~5 d 的相关生理生化指标。

### 1.2.7 相关生理生化指标的分析

取干旱胁迫处理前后的 OsmiR530-OE 水稻植株和野生型日本晴水稻植株相同部位的叶片, 按照上海苗彩生物科技有限公司超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(货号 ZC-S0350)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(货号 ZC-S0351)、过氧化物酶(POD)检测试剂盒(货号 ZC-S0352)说明书测定 SOD、CAT、POD 活性。

### 1.2.8 转基因水稻植株的农艺性状的观察与统计

待水稻成熟结实后随机选取 OsmiR530-OE 水稻植株和野生型日本晴水稻植株各 20 株, 分别测定和分析株高、穗长、剑叶长、剑叶宽、倒二叶长、第一茎节长、第二茎节长、千粒质量和结实率等农艺性状。

## 1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析; 采用 Office 2016 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 OsmiR530 的靶基因预测结果

采用靶基因预测软件筛选出可能的 OsmiR530-5p 靶基因 5 个, 分别是 *OsPWI*、*OsDUF594*、*OsE1*、*OsTAP46* 和 *OSC3HC4*(表 3); OsmiR530-3p 的靶基因有 2 个, 分别是 *OsYLS9* 和 *Os2OG*(表 4)。

表3 OsmiR530-5p 靶基因信息

基因名称	基因号	基因长度/bp	编码氨基酸数	蛋白等电点	相对分子质量	功能
<i>OsPWI</i>	LOC_Os08g32100	2 760	919	5.4	102 510.0	转座子蛋白
<i>OsDUF594</i>	LOC_Os07g16600	2 313	770	7.5	87 588.4	DUF594 家族蛋白
<i>OsEI</i>	LOC_Os01g01120	930	309	6.1	33 825.1	磷酸酶
<i>OsTAP46</i>	LOC_Os11g04520	1 257	418	5.1	47 246.2	磷酸酶
<i>OsC3HC4</i>	LOC_Os04g51400	1 104	367	8.6	41 032.4	锌指蛋白

表4 OsmiR530-3p 靶基因信息

基因名称	基因号	基因长度/bp	编码氨基酸数	蛋白等电点	相对分子质量	功能
<i>OsYLS9</i>	LOC_Os12g06210	675	224	9.8	23 060.7	LEA 蛋白
<i>Os2OG</i>	LOC_Os11g16460	363	121	5.9	12 784.5	氧化还原酶

通过 TargetP 1.1 server 对 OsmiR530 靶基因进行亚细胞定位预测, 结果如表 5 所示。OsmiR530-5p 的 5 个靶基因亚细胞定位预测结果表明, *OsPWI* 和 *OsEI* 定位于叶绿体, 推测 *OsPWI* 和 *OsEI* 所编码的蛋白为叶绿体转运肽; *OsDUF594* 在信号肽中的得分最高, 定位于细胞质, 推测 *OsDUF594* 编码的蛋白为信号肽分子; *OsTAP46* 和 *OSC3HC4* 在其他亚

细胞中的得分较高, 且可信程度高, 推测 *OsTAP46* 和 *OSC3HC4* 编码蛋白定位于细胞质中除叶绿体与线粒体外的其他位置。OsmiR530-3p 的 2 个预测靶基因中, *OsYLS9* 在信号肽中的得分最高, 定位于细胞质, 推测 *OsYLS9* 编码的蛋白为信号肽分子; *Os2OG* 定位于叶绿体和细胞质, 推测 *Os2OG* 所编码的蛋白为叶绿体转运肽(表 6)。

表5 OsmiR530-5p 靶基因亚细胞定位预测

基因名称	叶绿体转运肽得分	线粒体靶向肽得分	信号肽得分	其他亚细胞得分	基因表达部位	可信程度
<i>OsPWI</i>	0.801	0.024	0.012	0.426	叶绿体	4
<i>OsDUF594</i>	0.003	0.064	0.829	0.427	细胞质	3
<i>OsEI</i>	0.763	0.269	0.008	0.044	叶绿体	3
<i>OsTAP46</i>	0.080	0.074	0.182	0.684	—	3
<i>OSC3HC4</i>	0.038	0.358	0.005	0.834	—	3

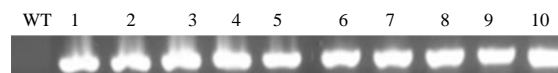
表6 OsmiR530-3p 靶基因亚细胞定位预测

基因名称	叶绿体转运肽得分	线粒体靶向肽得分	信号肽得分	其他亚细胞得分	基因表达部位	可信程度
<i>OsYLS9</i>	0.004	0.218	0.830	0.071	细胞质	2
<i>Os2OG</i>	0.492	0.083	0.137	0.360	叶绿体、细胞质	5

## 2.2 T0 和 T1 代水稻转化植株的 DNA 水平检测和转录水平检测

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 水平检测为阳性的 OsmiR530 转化水稻植株有 29 株, 图 1 为部分检测结果, 说明所构建的 pCUbi1390-OsmiR530 过表达载体成功转化, 获得了 T0 代阳性转化植株。OsmiR530 表达的 qRT-PCR 结果如图 2 所示。与 CK 相比, T0 代 OsmiR530 水稻转化植株中, 编号为 0、4、20、8、18 的株系 OsmiR530-3p

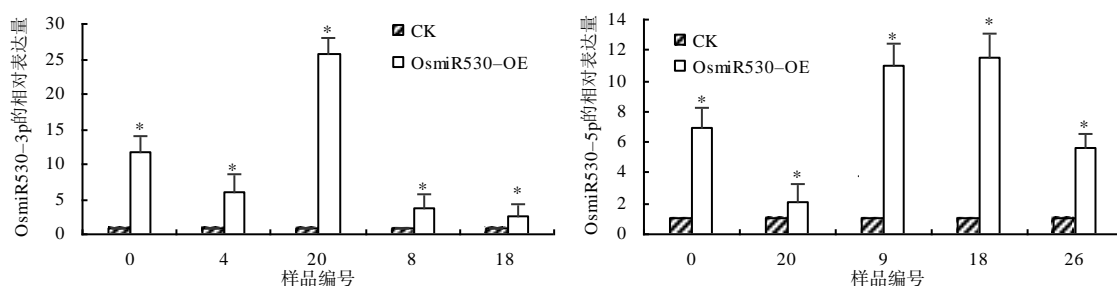
表达显著上调, 编号为 0、20、9、18、26 的株系 OsmiR530-5p 表达显著上调。半定量结果(图 3)显示过表达转化株系的 OsmiR530-5p 和 OsmiR530-3p 的表达量均显著上调且高于野生型的。说明成功获得了 OsmiR530-OE 水稻株系。



WT 对照; 1~10 阳性植株。

图1 OsmiRNA 转化水稻 T0 代植株 DNA 水平检测结果

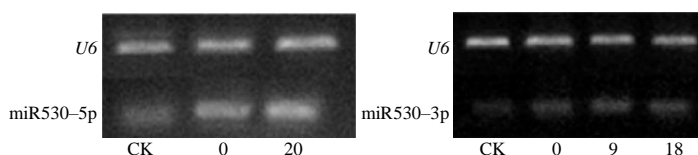
Fig.1 Detection result of DNA level in OsmiRNA transgenic plants



“\*”示同一样品处理与 CK 间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图 2 OsmiRNA 转化水稻 T0 代植株的 qRT-PCR 分析结果

Fig.2 qRT-PCR analysis result of OsmiRNA overexpression transgenic plants



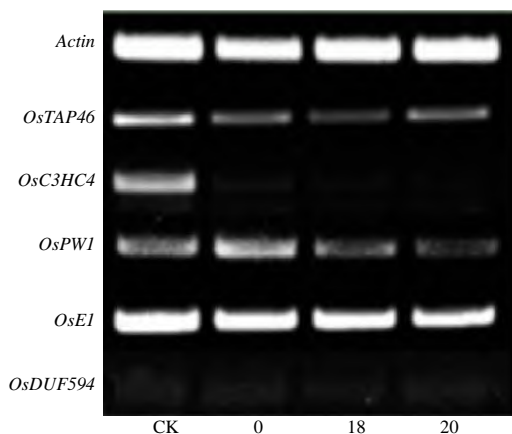
序号 0、9、18、20 为 OsmiR530 过表达株系。

图 3 OsmiRNA 转化水稻 T1 代植株 OsmiRNA 的半定量 RT-PCR 分析结果

Fig.3 Semiquantitative RT-PCR analysis result of OsmiRNA in OsmiRNA overexpression transgenic plant

### 2.3 OsmiR530-OE 转基因水稻植株中靶基因表达水平分析

如图 4 所示, OsmiR530-5p 所预测的靶基因 *OsTAP46*、*OsC3HC4*、*OsPWI* 和 *OsE1* 在 OsmiR530-OE 转基因植株中的表达量都有不同程度的下调, 而所预测的靶基因 *OsDUF594* 的表达量变化不明显, 推测 *OsTAP46*、*OsC3HC4*、*OsPWI* 和 *OsE1* 可能为 OsmiR530 的靶基因。



序号 0、18、20 是 OsmiR530 过表达株系。

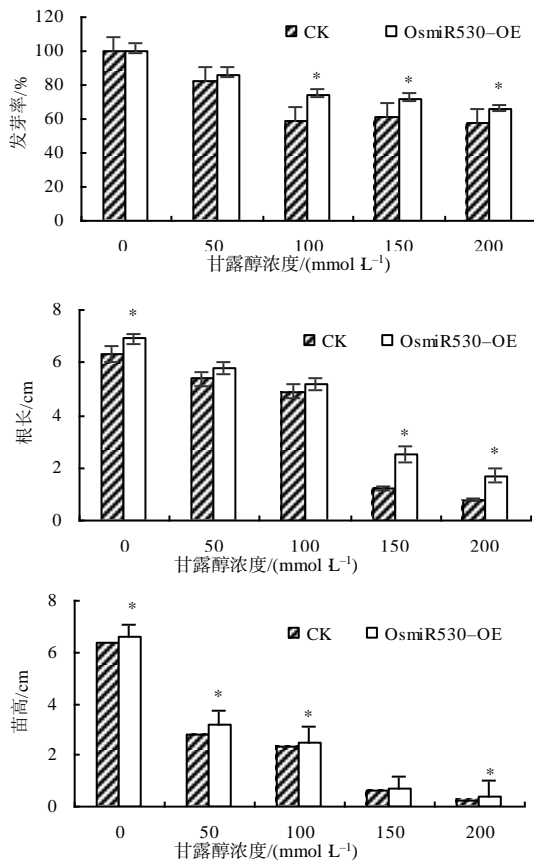
图 4 OsmiRNA 转化水稻 T1 代植株 OsmiR530-5p 的靶基因的半定量 RT-PCR 分析结果

Fig.4 Semiquantitative RT-PCR analysis result of OsmiRNA target genes in OsmiR530-5p overexpression transgenic plants

### 2.4 干旱和盐胁迫对转基因水稻种子的影响

#### 2.4.1 干旱胁迫的影响

从图 5 可以看出, 在 0、50 mmol/L 甘露醇处理下, OsmiR530-OE 水稻材料与 CK 的发芽率有差异, 但不显著; 而在 100 mmol/L 甘露醇处理时, OsmiR530-OE 水稻种子的发芽率显著高于野生型的; 150、200 mmol/L 的甘露醇处理后 OsmiR530-OE 水稻和 CK 的发芽率下降, 但 OsmiR530-OE 水稻的发芽率仍显著高于 CK 的。对模拟干旱胁迫处理 10 d 后的 OsmiR530-OE 水稻根长统计分析发现, 幼苗的根长随着甘露醇浓度的升高而降低; 无甘露醇处理时, OsmiR530-OE 的根长显著长于 CK 的; 在 50、100 mmol/L 甘露醇处理后, CK 与 OsmiR530-OE 的根长均短于无甘露醇处理的; 而在 150、200 mmol/L 甘露醇处理后 OsmiR530-OE 的根长显著长于 CK 的。对模拟干旱胁迫处理 10 d 后的 OsmiR530-OE 和 CK 的苗高进行统计分析发现, 在无甘露醇及甘露醇浓度为 50、100、200 mmol/L 时, OsmiR530-OE 的苗高均显著高于 CK 的。以上结果表明在一定浓度甘露醇模拟干旱胁迫条件下, OsmiR530 能提高水稻种子的发芽率和萌芽期幼苗对干旱胁迫的适应性。



“\*”示同一浓度不同水稻间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

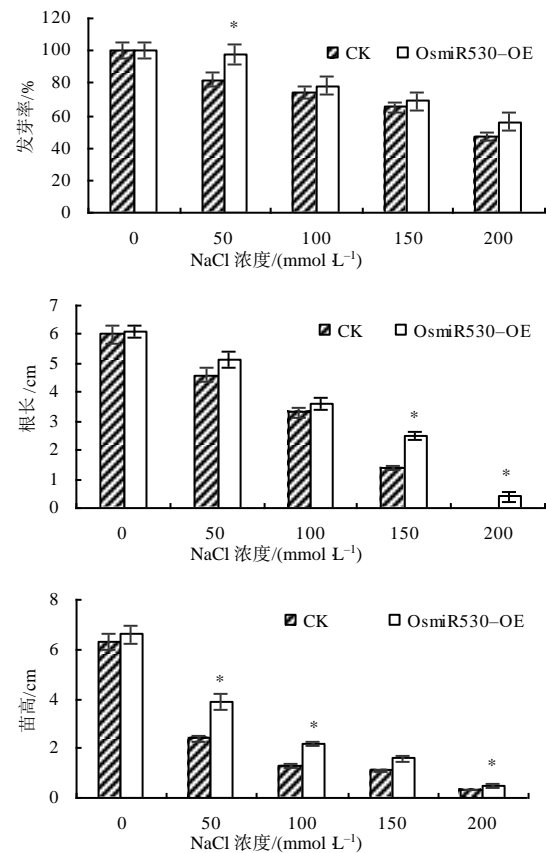
图5 甘露醇处理 OsmiR530-OE 水稻种子的发芽率、根长和苗高

Fig.5 The germination rate, root length and seedling height of OsmiR530-OE rice seeds treated by mannitol concentrations

#### 2.4.2 盐胁迫的影响

对 OsmiR530-OE 水稻材料以及野生型水稻种子进行盐胁迫处理,统计种子的发芽率以及 10 d 后水稻种子的根长和苗高。从图 6 可以看出,50、100、150、200 mmol/L 的 NaCl 处理后 OsmiR530-OE 水稻种子的发芽率高于 CK 的,且 50 mmol/L 处理的 OsmiR530-OE 发芽率显著高于 CK 的。50、100 mmol/L NaCl 处理下, OsmiR530-OE 的根长略长于 CK 的,150、200 mmol/L 的高浓度 NaCl 处理后, OsmiR530-OE 的根长显著长于 CK 的。150 mmol/L 的高浓度 NaCl 处理后, OsmiR530-OE 的苗高略高于 CK 的,50、100、200 mmol/L 的 NaCl 处理后

OsmiR530-OE 水稻的苗高显著高于 CK 的。可见,在一定浓度盐胁迫下, OsmiR530 提高了种子的发芽率和萌芽期幼苗对盐胁迫的适应能力。



“\*”示同一浓度不同水稻间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

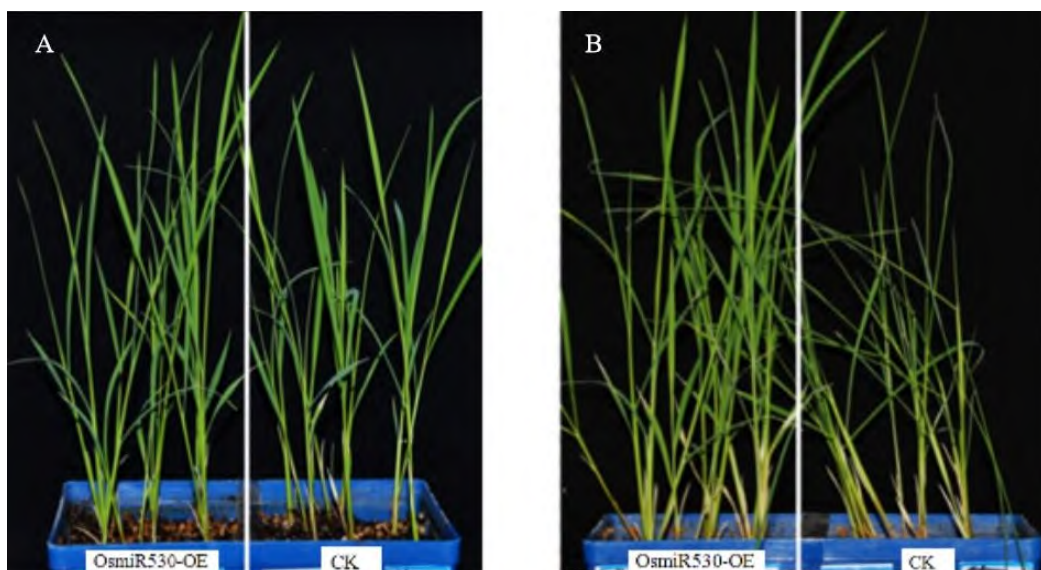
图6 NaCl 处理 OsmiR530-OE 水稻种子的发芽率、根长和苗高

Fig.6 The germination percentage, root length and seedling height of OsmiR530-OE rice seeds treated by NaCl

## 2.5 转基因水稻幼苗对自然干旱胁迫和盐胁迫的响应

### 2.5.1 对干旱胁迫的响应

在干旱处理前, OsmiR530-OE 转基因水稻幼苗和 CK 的生长状况基本一致(图 7-A); 干旱处理 5 d 后, OsmiR530-OE 转基因水稻幼苗叶片基本不卷曲, 而 CK 幼苗植株部分叶片出现卷曲以及倒伏现象(图 7-B)。可见, OsmiR530 会提高水稻幼苗对干旱胁迫的耐受性。



A 水稻幼苗处理前表型; B 水稻幼苗干旱处理后表型。

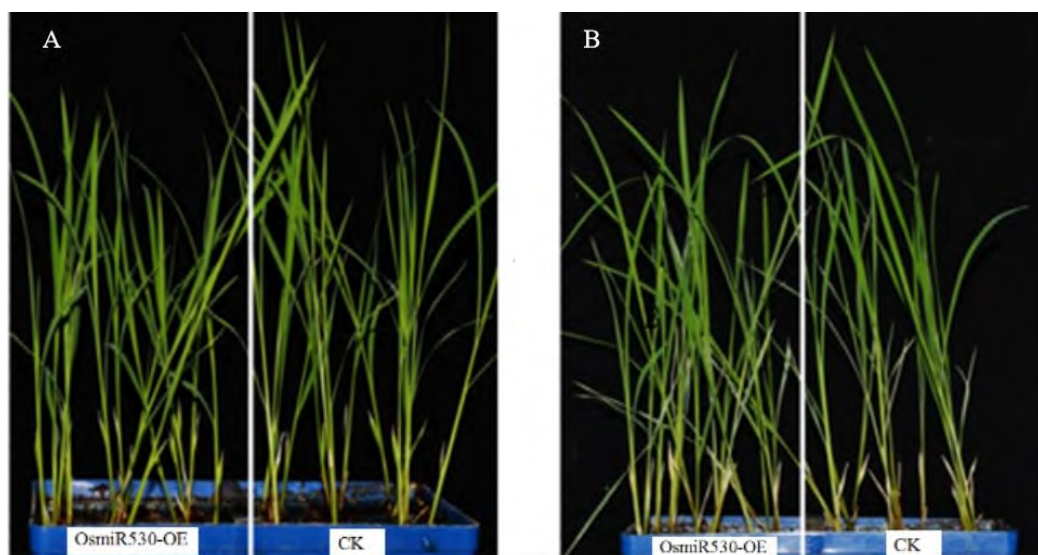
图 7 OsmiR530-OE 水稻幼苗干旱处理前后的表型

Fig.7 The phenotypes of OsmiR530-OE rice seedlings before and after drought treatment

### 2.5.2 对盐胁迫的响应

为了进一步研究 OsmiR530 过表达对盐胁迫响应的的影响,对水稻进行盐胁迫处理,在盐处理前,CK 和 OsmiR530-OE 转基因水稻幼苗的生长状况基本一致(图 8-A);盐处理 5 d 后,与野生型幼苗植株

的生长状况相比,OsmiR530-OE 转基因水稻幼苗叶片基本不卷曲、不倒伏,且表型没有明显变化(图 8-B),而 CK 幼苗植株叶片出现部分倒伏现象。可见,OsmiR530 可增强水稻幼苗对盐胁迫的耐受性。



A 水稻幼苗未处理前的表型; B 水稻幼苗盐处理后的表型。

图 8 OsmiR530-OE 水稻幼苗盐胁迫处理前后的表型

Fig.8 The phenotypes of OsmiR530-OE rice seedlings before and after salt treatment

### 2.6 OsmiR530-OE 水稻干旱处理前后生理生化指标分析

高活性 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶对于减轻逆境所造成的细胞膜损伤有重要作用。干旱处理前、后植株的 SOD、POD 和 CAT 活性测定结果(表

7)表明,在干旱处理后,OsmiR530-OE 水稻植株中的 SOD、POD 和 CAT 活性较处理前均显著增加。推断过表达 OsmiR530 会提高水稻植株对于干旱胁迫的耐受性。

表7 开花期 OsmiR530-OE 水稻干旱处理后 SOD、CAT、POD 活性

处理	SOD 活性		CAT 活性		POD 活性	
	CK	OsmiR530-OE	CK	OsmiR530-OE	CK	OsmiR530-OE
处理前	430	470b	845	1 031b	525	708b
干旱胁迫	425	490a	852	1 134a	513	729a

同列不同字母示处理间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.7 转基因水稻植株的农艺性状观察与统计

对 OsmiR530-OE 水稻植株与野生型日本晴水稻植株的相关农艺性状进行统计分析,结果(表 8)显示:与野生型的相比,OsmiR530-OE 水稻植株剑叶的长度与宽度显著减小,导致 OsmiR530-OE 转基因水稻植株的叶表面积显著减小;千粒质量与结

实率均显著低于野生型水稻植株的;其他农艺性状,如分蘖数、株高、穗长、倒二叶长、第一茎节长以及第二茎节长均无显著差异。OsmiR530-OE 水稻植株分蘖数增加,而其他的农艺性状的指标降低,说明过表达 OsmiR530 对水稻植株的生长发育有抑制作用。

表8 OsmiR530-OE 水稻的农艺性状

Table 8 The agronomic traits of OsmiR530-OE rice

材料	分蘖数	株高/cm	穗长/cm	剑叶长/cm	剑叶宽/cm	倒二叶长/cm	第一茎节长/cm	第二茎节长/cm	千粒质量/g	结实率/%
CK	49	63	18.5	24.3a	14.1a	24.5	21.3	18.5	23.7a	82.8a
OsmiR530-OE	53	60	16.7	22.1b	11.5b	22.0	20.6	18.3	19.0b	70.5b

同列不同字母示处理间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

LIU 等<sup>[11]</sup>使用 miRNA 微阵列鉴定存在于水稻不同发育阶段的差异 miRNA,发现在水稻籽粒的形成过程中 miR530 表达显著上调。盐、干旱和热处理导致了番茄 miR167a 表达量下调<sup>[12]</sup>,表明不同胁迫激活了 miR167a 调控替代机制。李春贺等<sup>[13]</sup>利用 miRNA 基因芯片杂交技术对盐胁迫条件下耐盐棉花品系和盐敏感棉花品种的 miRNA 进行差异表达分析,发现在盐胁迫条件下耐盐棉花品系中的 miR156、miR164、miR167、miR397 和 miR399 的表达量较盐敏感品系的表达上调。ZHANG 等<sup>[14]</sup>敲除水稻 miR166 发现,敲除后的水稻表现出卷叶表型,蒸腾速率降低,提高了水稻的抗旱性。AWASTHI 等<sup>[15]</sup>研究发现,干旱胁迫下 peg 诱导的依赖 RNA 聚合酶和平衡核苷转运蛋白的新型 miRNAs osa-miR12470 和 osa-miR12473 的丰度下降,植物的核酸降解和合成总体增加,表明响应干旱的 miRNA 可能有助于控制细胞丰度。MACOVEI 等<sup>[16]</sup>发现,盐胁迫下 osa-miR414、osa-miR164e 和 osa-miR408 的表达水平下降,而解旋酶含量增加,推测 miRNA 是通过调控基因的重组、修复、复制来适应外界环境变化的。在匍匐弯草<sup>[6]</sup>和柳枝稷<sup>[17]</sup>中分别

过表达 osa-miR319a 和 osa-miR319b,可以提高转基因植株的耐盐性,表明 miR319 正调控植物耐盐性。彭艳等<sup>[18]</sup>推断在高温、干旱胁迫条件下,osa-miR5144-3p、osa-miR2878-3p、osa-miR1848、osa-miR1862e/f/g、osa-miR529b 和 osa-miR5498 可能在水稻花器官防止蛋白沉淀、促进蛋白正确折叠中起重要作用。本研究中,以 OsmiR530-OE 转基因水稻植株为材料,分析了在种子萌芽期以及幼苗期对不同逆境胁迫的响应,发现 OsmiR530 能够增强种子的萌芽率并提高幼苗对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性。在转基因水稻中预测 OsmiR530 的靶基因 *OsTAP46*、*OsC3HC4*、*OsPWI* 和 *OsE1* 的表达水平比对照低,推测 OsmiR530 可能通过调控这些靶基因的表达来影响水稻对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性。

## 参考文献:

- [1] 岳慧芳,任永哲,王志强,等. circRNAs 在植物中的研究进展[J]. 西北植物学报, 2018, 38(2): 386-392.
- [2] ZHANG X H, ZOU Z, GONG P J, et al. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(2): 403-409.
- [3] 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.
- [4] ZHAO B T, GE L F, LIANG R Q, et al. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 29.
- [5] 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.
- [6] ZHOU M, LI D Y, LI Z G, et al. Constitutive expression of a *miR319* gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1375–1391.
- [7] YUAN S R, LI Z G, LI D Y, et al. Constitutive expression of rice *microRNA528* alters plant development and enhances tolerance to salinity stress and nitrogen starvation in creeping bentgrass[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 576–593.
- [8] 黄宗贵. 水稻 miR528 调控盐胁迫应答功能的初步研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- [9] 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.
- [10] VARKONYI-GASIC E, WU R M, WOOD M, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs[J]. *Plant Methods*, 2007, 3: 12.
- [11] LIU H, SHEN D, JIA S, et al. Microarray-based screening of the microRNAs associated with caryopsis development in *Oryza sativa*[J]. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(2): 255–261.
- [12] JODDER J, DAS R, SARKAR D, et al. Distinct transcriptional and processing regulations control miR167a level in tomato during stress[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(1): 130–143.
- [13] 李春贺, 阴祖军, 刘玉栋, 等. 盐胁迫条件下不同耐盐棉花 miRNA 差异表达研究[J]. *山东农业科学*, 2009, 41(7): 12–17.
- [14] ZHANG J S, ZHANG H, SRIVASTAVA A K, et al. Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development[J]. *Plant physiology*, 2018, 176(3): 2082–2094.
- [15] AWASTHI J P, CHANDRA T, MISHRA S, et al. Identification and characterization of drought responsive miRNAs in a drought tolerant upland rice cultivar KMJ 1-12-3[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 137: 62–74.
- [16] MACOVEI A, TUTEJA N. MicroRNAs targeting DEAD-box helicases are involved in salinity stress response in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 183.
- [17] LIU Y R, LI D Y, YAN J P, et al. MiR319-mediated ethylene biosynthesis, signalling and salt stress response in switchgrass[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(12): 2370–2383.
- [18] 彭艳, 刘跃武, 刘伯涵, 等. 高温干旱胁迫下水稻花器官中敏感基因的筛选[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 48(1): 13–21.

责任编辑: 毛友纯  
英文编辑: 柳正