

· 研究报告 ·

Bna-miR43介导甘蓝型油菜响应干旱胁迫

张盈川¹, 吴晓明玉¹, 陶保龙¹, 陈丽^{1,2}, 鲁海琴¹, 赵伦¹, 文静¹
易斌¹, 涂金星¹, 傅廷栋¹, 沈金雄^{1*}

¹华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家油菜工程技术研究中心, 武汉 430070

²长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100

摘要 miRNA通过调控靶基因的表达参与植物生长发育和响应逆境胁迫等多个方面。对前期鉴定到的1个miRNA——Bna-miR43进行功能研究, 通过构建过表达载体探讨了Bna-miR43在甘蓝型油菜(*Brassica napus*)响应干旱胁迫中的功能。降解组测序预测到Bna-miR43的4个靶基因均属于F-box蛋白家族。在模拟干旱条件下, 甘蓝型油菜J572根系Bna-miR43的表达量逐渐下降; 靶基因则呈现与Bna-miR43相反的表达模式, 且随着干旱处理时间的增加, 靶基因的表达量逐渐上升。转基因实验表明, 在干旱胁迫下, 油菜Bna-miR43过表达株系表现为对干旱极度敏感, 转基因株系种子在干旱条件下发芽率显著下降, 植株脱水严重, 体内积累了更多的丙二醛(MDA)和过氧化氢(H₂O₂)。干旱处理后, Bna-miR43过表达株系中编码超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和乙醇酸氧化酶(GOX)的3个基因下调表达。上述结果表明, Bna-miR43通过调控靶基因的表达调节甘蓝型油菜渗透物质积累和细胞活性氧(ROS)稳态, 在调控植物耐旱性中发挥重要作用。

关键词 甘蓝型油菜, Bna-miR43, F-box, 干旱胁迫

张盈川, 吴晓明玉, 陶保龙, 陈丽, 鲁海琴, 赵伦, 文静, 易斌, 涂金星, 傅廷栋, 沈金雄 (2023). Bna-miR43介导甘蓝型油菜响应干旱胁迫. 植物学报 58, 701–711.

干旱对植物的呼吸作用、光合作用、营养物质的合成与运输等都有一定的影响。干旱导致植物体内水分关系改变、光合作用效率降低、细胞活性氧积累以及酶活性改变(Batool et al., 2020)。甘蓝型油菜(*Brassica napus*)在缺水条件下生长速率减慢, 叶绿素含量、相对含水量以及可溶性蛋白质含量显著降低, 膜通透性、脯氨酸、丙二醛、总酚和过氧化氢酶含量则显著增加(Akram et al., 2018)。干旱使植物体内产生大量活性氧。细胞内的抗氧化酶以及一些抗氧化物质可通过防止氧化应激反应增强植物的抗氧化活性(Nadeem et al., 2019)。植物通过调节体内多种激素的合成和降解来适应干旱。在ABA的调控下, 叶片通过关闭气孔以及减缓生长来适应干旱(Ji et al., 2011)。OsPYL/RCARs为水稻(*Oryza sativa*)中调节ABA依赖性基因表达的功能性受体。过表达OsPYL/RCARs可以增强水稻的耐旱性(Kim et al.,

2014)。在干旱条件下, 植物可以合成脯氨酸、甜菜碱和糖类物质等渗透性化合物。其中, 脯氨酸是主要的渗透保护剂。植物体主要通过线粒体的生物合成以及缓慢氧化这两条途径积累脯氨酸(Hu et al., 2015)。脯氨酸的主要功能是稳定胞内大分子物质(酶和蛋白质等)、维持质膜完整性以及清除胞内活性氧(Kaur and Asthir, 2017)。目前, 在不同作物中已经鉴定到多个响应干旱胁迫的基因, 其中包括部分转录因子(AREB、AP2/ERF、NAC、bZIP、bHLH、MYC和MYB), 它们通过调控下游基因的表达参与干旱胁迫应答(Danquah et al., 2014)。

miRNA影响干旱胁迫响应基因的表达, 是植物抗旱的重要调控因子。研究表明, 植物miRNA通过靶向切割mRNA或抑制靶mRNA的翻译在植物抵御逆境胁迫中起重要作用(吴丹丹等, 2021)。miRNA通过靶向MYB、NAC和HD-ZIP等转录因子参与ABA介导

收稿日期: 2022-09-16; 接受日期: 2023-02-25

基金项目: 湖北省重点研发计划(No.2022ABA001)

* 通讯作者。E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

的植物耐旱途径。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)受到干旱胁迫后, miR169a表达量下降, 诱导NF-Y转录物积累, 过表达miR169a表现为拟南芥对干旱敏感(Li et al., 2008)。miR398的靶基因编码蛋白铜/锌超氧化物歧化酶可以清除体内积累的过量活性氧, 从而在干旱胁迫中发挥重要作用(Liu et al., 2019)。对miR159a、miR168、miR393和miR408的启动子区域进行预测, 结果表明这些miRNAs的启动子区域均含有ABA响应元件, 可能直接或间接接受ABA调控参与干旱胁迫响应(Shah and Ullah, 2021)。

植物响应胁迫由多基因共同控制, miRNA通过负调控靶基因参与植物响应胁迫。本实验室前期研究发现, Bna-miR43通过调控靶基因响应铝胁迫, 过表达Bna-miR43的甘蓝型油菜表现更耐受铝胁迫(张盈川等, 2022)。我们注意到Bna-miR43的靶基因不仅为胁迫相关基因, 而且靶基因启动子上含有大量响应干旱胁迫的元件, 而Bna-miR43是否响应干旱胁迫需深入探究。目前, 关于miRNA在干旱胁迫中的功能研究较少, 主要集中在几种已熟知的miRNAs。虽然通过高通量测序技术鉴定到越来越多响应干旱胁迫的新miRNAs, 但仍需对靶基因进行功能研究, 以探明在干旱胁迫下miRNAs介导的相关信号通路和调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) J572由华中农业大学油菜研究室周永明教授课题组惠赠; 过表达载体PS2300为本实验室自备。

表1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 The primer sequences of qRT-PCR

Gene	Annotation	Primer sequence (5'-3')
<i>BnaC05g39240D</i>	COX1	F: CAAGAACAGGAAAGTGTTGAG R: GCAACGTGAACCTGTTCTTAAT
<i>BnaA07g11360D</i>	CAT1	F: AATCGTCTTTGCATCATCCATG R: GTCAAAGAGGAGTTGTTGTTCC
<i>BnaC08g42970D</i>	SOD1	F: GATCACAAAACATATGGCCAAGG R: AAACAGTTCCTGTACAGTAGT
<i>BnaC09g53650D</i>	ABI2	F: GATGAGTTTGATCCGAGATCGA R: TGAAGTTCGAAAGCAAGCTTCTACT
<i>BnaC01g04330D</i>	ABF	F: GCCGATTTGACTAGATCAACAC R: CGTCCTAGAAAGCAACATCAAG
<i>BnaA10g24440D</i>	ABCG22	F: TTGATGATCTTGATTGACACGC R: CCAAACGCACAACCTGTAACATA

1.2 基因家族生物信息学分析

使用psRNATarget网站对miRNA及其靶基因的配对信息进行分析。选择基因上游2 kb序列在PLANTCARE网站进行启动子顺式作用元件分析。使用DNAMAN软件对目的序列进行比对。使用BrassicaEDB网站对靶基因在甘蓝型油菜中的表达模式进行分析。

1.3 Bna-miR43过表达载体的构建

将Bna-miR43前体在芸薹属数据库中进行序列比对, 选择Bna-miR43前体前后各400 bp的序列设计引物。将序列连接到过表达载体PS2300后, 经PCR鉴定阳性克隆, 测序正确后提取质粒, 将其转化到农杆菌GV3101中, 于-80°C冰箱中保存。

1.4 油菜遗传转化

以甘蓝型油菜J572为材料, 使用农杆菌GV3101进行油菜下胚轴遗传转化, 获得Bna-miR43的过表达甘蓝型油菜转基因株系。具体步骤参考陈丽(2018)的方法。

1.5 基因表达分析

采用TRIzol试剂(Invitrogen™, US)提取总RNA, 具体方法参考说明书。采用茎环法反转录miRNA。通过荧光定量PCR分析Bna-miR43及其靶基因的表达量, 靶基因内参为*BnaActin*, miRNA内参为*U6* (表1)。

1.6 干旱胁迫瞬时处理

将J572油菜种子表面用75%乙醇消毒后放入网格状播种盒中发芽1周, 然后转入霍格兰营养液中培养1周, 2周后将油菜幼苗转入含有10% PEG6000的霍格

兰营养液中,分别在0、2、4、8、12和24小时取样,均设3次生物学重复,样品于-80°C冰箱中保存。

1.7 种子发芽率测定

选择本研究中3个Bna-miR43过表达株系(OE2、OE3和OE5)以及对照(J572)进行发芽试验。将油菜种子表面用75%乙醇消毒15分钟,然后用超纯水清洗3遍。在培养皿中铺2层纱布,对照组培养皿用超纯水浸湿后,培养皿中一半点入J572种子,一半点入过表达株系种子。实验组用15% PEG将纱布浸湿后,在培养皿中一半点入J572种子,一半点入过表达株系种子。每个株系做3次重复。在温度24°C、光周期为16小时光照/8小时黑暗条件下发芽1周,1周后统计种子发芽率。

1.8 转基因植株干旱胁迫表型鉴定

挑选大小均匀一致的J572与转基因油菜种子,表面用75%乙醇进行表面消毒后,放入培养皿中进行发芽。待幼芽发育7天后,将其移至水培盒中固定生长。3周后选取长势相同的四叶期J572幼苗以及不同转基因株系的阳性幼苗各50株,分为对照组与处理组。对照组用霍格兰营养液培养,处理组用含15% PEG600的霍格兰营养液培养,处理时间为3天,期间用相机拍照记录表型。

1.9 根系过氧化氢和丙二醛含量检测

使用H₂O₂含量检测试剂盒(Solarbio,北京)测定油菜组织中过氧化氢含量;使用MDA含量检测试剂盒(Solarbio,北京)测定油菜组织中丙二醛含量。随机选取不同株系的3株油菜新鲜根系,参照说明书方法进行测定。

2 结果与讨论

2.1 Bna-miR43及其靶基因的基本信息

Bna-miR43的成熟体序列长度为21 nt (5'-GAAGA-TTGAACATTGGGACC-3')。利用RNAFold绘制Bna-miR43前体的二级结构(图1A),其前体可以形成茎环结构且Bna-miR43的成熟体位于茎部,最小自由能为-24.37 kcal·mol⁻¹。

实验室前期测序预测到4个Bna-miR43靶向的基因(*BnaA09g03940D*、*BnaCnng24950D*、*BnaA06-*

*g06260D*和*BnaC05g08010D*)。基于测序结果,使用在线工具psRNATarget进一步推测靶基因。结果表明*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*为Bna-miR43的靶基因(图1B)。在甘蓝型油菜数据库(BRAD (brassicadb.cn))中进行对比分析,靶基因*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*均属于F-box/Leucine Rich repeat蛋白基因家族(图1C, D)。同时,其拟南芥同源基因均为AT5G279290。为验证靶基因mRNA是否被Bna-miR43切割,通过RLM-RACE验证Bna-miR43的候选靶基因,表明Bna-miR43可在转录后水平对*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*进行调控(张盈川等,2022)。

2.2 Bna-miR43靶基因的生物功能预测

利用启动子在线分析软件,将验证到的靶基因及拟南芥同源基因进行顺式作用元件分析(图2)。结果表明,在靶基因及拟南芥同源基因中均鉴定到多个与逆境胁迫相关的作用元件以及植物激素响应调控元件,如ABA responsiveness (参与响应脱落酸信号途径)、LTR (参与植物响应低温胁迫)、MeJA responsiveness (参与响应茉莉酸甲酯)、MBS (MYB结合位点,参与干旱反应)和ARE (生长素响应元件)。其中,靶基因和拟南芥同源基因中ABA响应元件和MeJA响应元件最多。由于启动子对于基因响应逆境胁迫具有重要作用,因此推测Bna-miR43的靶基因可能参与响应干旱胁迫。

2.3 Bna-miR43靶基因在甘蓝型油菜不同组织中的表达模式

利用BrassicaEDB网站对Bna-miR43靶基因在甘蓝型油菜中的表达模式进行分析。结果显示,靶基因*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*具有相似的表达模式,在甘蓝型油菜发育过程中的各个时期和组织器官中均有表达,表明Bna-miR43及其靶基因可能对于甘蓝型油菜不同发育时期的不同组织器官均有一定的调控作用。2个靶基因均在花中的表达量较高,*BnaA09g03940D*在种子中的表达量也较高(图3)。

2.4 Bna-miR43及其靶基因响应干旱胁迫的表达量分析

在J572幼苗期对根系取样,进行干旱胁迫下Bna-

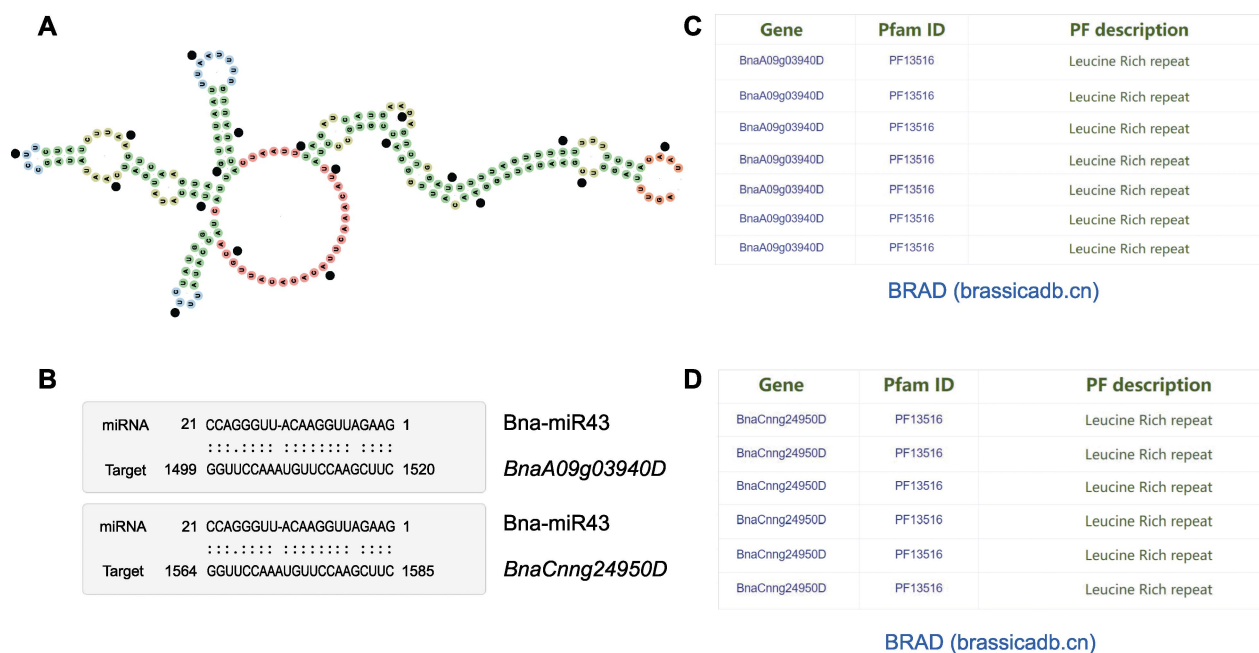


图1 Bna-miR43及其靶基因的基本信息

(A) Bna-miR43前体二级结构预测; (B) Bna-miR43及其靶基因之间的碱基互补配对; (C) *BnaA09g03940D*的结构域注释; (D) *BnaCnng24950D*的结构域注释

Figure 1 Basic information of Bna-miR43 and its target gene

(A) Bna-miR43 precursor's secondary structure prediction; (B) Base pairing characterization between Bna-miR43 and its target genes; (C) The Pfam domain annotation of *BnaA09g03940D*; (D) The Pfam domain annotation of *BnaCnng24950D*

	Adversity response element					Hormone response element		
	MYB	LTR	ARE	MBS	Salicylic-resp	GAs-resp	MeJA-resp	ABA-resp
<i>AT5G27920</i>	12	0	2	0	0	0	8	9
<i>BnaA09g03940D</i>	9	1	4	1	1	1	10	10
<i>BnaCnng24950D</i>	2	5	3	1	0	0	10	12

图2 靶基因及拟南芥同源基因启动子顺式作用元件预测

Figure 2 Prediction of *cis* acting elements of target genes and *Arabidopsis* homologous gene

miR43及其靶基因的表达模式分析(图4)。结果表明,在干旱胁迫下J572体内的Bna-miR43表达量在处理第8、12和24小时出现较为明显的下调,靶基因*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*则在干旱胁迫后表达量呈上升趋势,说明Bna-miR43在油菜响应干旱胁迫中可能发挥调控作用。因此, Bna-miR43受干旱

胁迫诱导表达, Bna-miR43对靶基因具有一定的调控作用,两者之间存在此消彼长的关系。

2.5 干旱胁迫下油菜表型变化

在模拟干旱条件下鉴定转基因油菜种子的发芽率。结果发现,在正常条件下,转基因株系表现出和对照

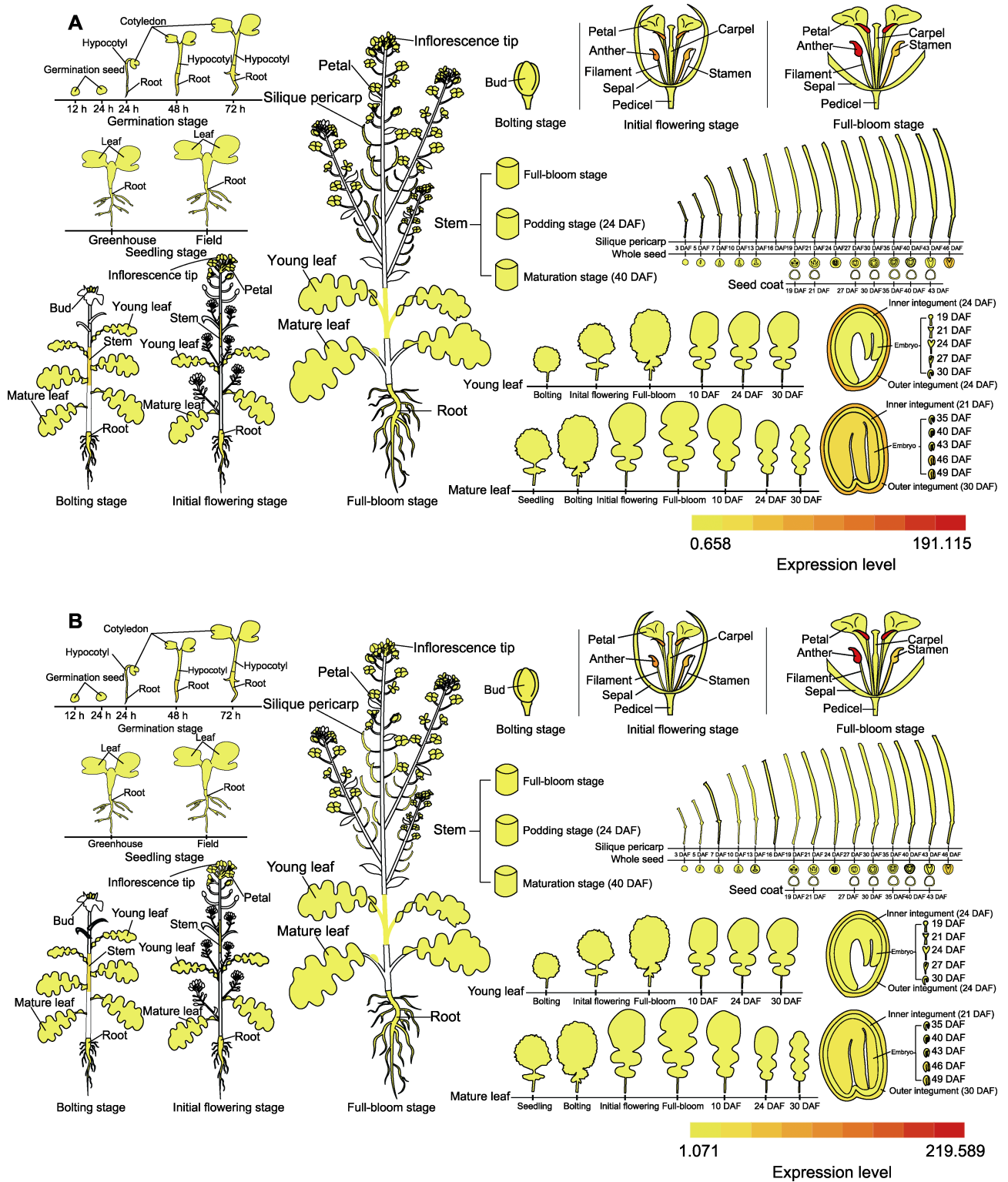


图3 靶基因在甘蓝型油菜中的表达模式
(A) *BnaA09g03940D*的表达模式; (B) *BnaCnng24950D*的表达模式

Figure 3 Expression patterns of target genes in *Brassica napus*
(A) The expression pattern of *BnaA09g03940D*; (B) The expression pattern of *BnaCnng24950D*

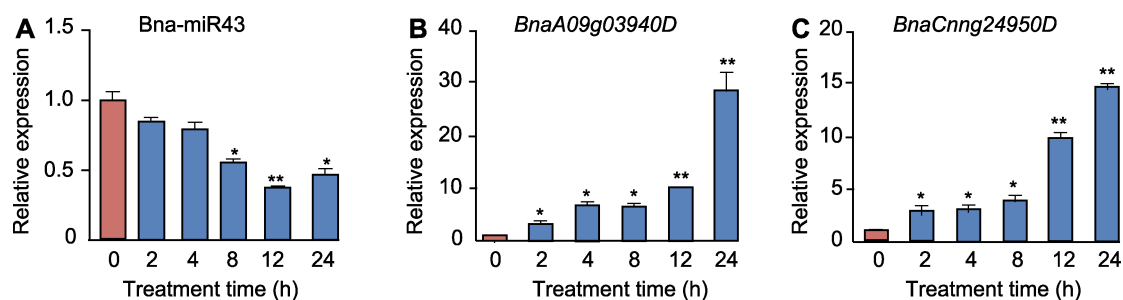


图4 干旱胁迫下甘蓝型油菜J572中Bna-miR43及其靶基因的表达模式

(A) Bna-miR43的表达模式; (B) *BnaA09g03940D*的表达模式; (C) *BnaCnng24950D*的表达模式。实验设3次生物学重复, 3次技术重复。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Figure 4 Expression patterns of Bna-miR43 and its target genes of *Brassica napus* under drought stress

(A) The expression pattern of Bna-miR43; (B) The expression pattern of *BnaA09g03940D*; (C) The expression pattern of *BnaCnng24950D*. Three biological replicates and three technical replicates per experiment. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

J572相同的发芽率。相反, 在干旱胁迫下, Bna-miR43过表达转基因株系的发芽率显著降低。在15% PEG处理下, 1周后对照J572的发芽率为90%, 而OE-2、OE-3和OE-5三个转基因株系发芽率显著低于对照(图5A)。上述结果表明, 过表达Bna-miR43影响甘蓝型油菜在干旱胁迫下的发芽率。

为探明过表达Bna-miR43转基因油菜对干旱胁迫的耐受性, 选取长势一致的J572和转基因油菜进行15% PEG模拟干旱处理。PEG模拟干旱处理72小时后, 对照J572和过表达Bna-miR43转基因油菜均表现出不同程度的萎蔫失水, 叶边向上卷曲皱缩, 植株脱水倒伏。其中, 处理后J572地上部受干旱(PEG)胁迫影响小于转基因油菜, 其叶片轻微向上卷曲, 个别叶片发生萎蔫, 植株长势基本正常, 仅个别植株倒伏; 转基因油菜受胁迫影响严重, 叶边上卷, 叶片严重失水皱缩, 植株主茎倒伏, 部分植株枯萎(图5B)。表型对比结果表明, PEG模拟干旱胁迫下, 过表达Bna-miR43油菜对干旱的耐受性减弱。

2.6 干旱胁迫下Bna-miR43过表达植株丙二醛和过氧化氢含量分析

干旱胁迫处理72小时后, 分别测定处理和未处理转基因和对照J572油菜根系MDA含量。结果表明, 干旱处理后根系MDA含量相比未处理材料有所上升, 上升幅度均在3.6倍以上。其中未进行干旱处理的油菜材料MDA含量均低于 $0.51 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 且转基因材料与对照J572根系MDA含量无显著差异。干旱处理的油菜材料中, J572的MDA含量最低, 3次重复平均值

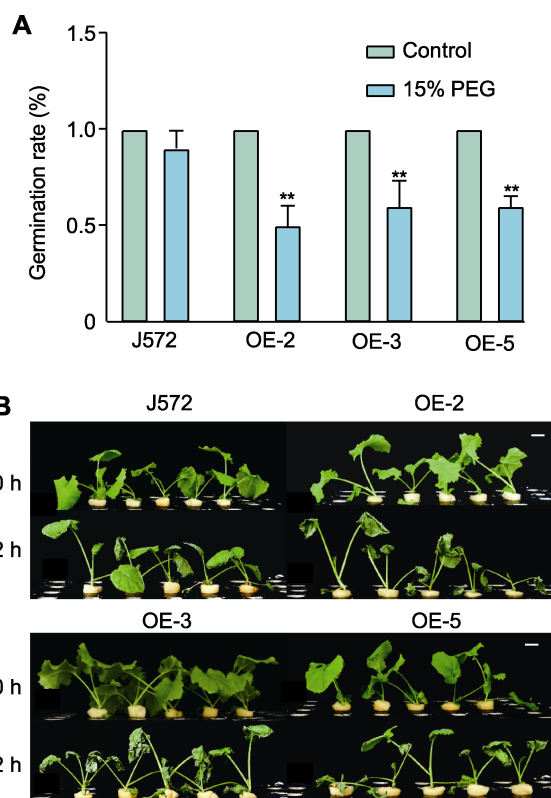


图5 干旱胁迫下甘蓝型油菜种子发芽率统计(A)及PEG模拟干旱处理下过表达Bna-miR43转基因植株地上部表型(B)
J572: 对照; OE-2、OE-3和OE-5为不同转基因株系; ** $P < 0.01$; Bars=1 cm

Figure 5 Germination rate of *Brassica napus* under drought stress (A) and phenotypic analysis of Bna-miR43 overexpressed transgenic plants under PEG simulated drought treatment (B)

J572: Control; OE-2, OE-3, and OE-5 indicate different transgenic individuals; ** $P < 0.01$; Bars=1 cm

为 $1.04 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$; 而转基因材料的MDA含量平均值为 $1.56 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中OE-3干旱胁迫后的MDA平均含量最高, 3次重复平均值为 $1.65 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (图6A)。上述结果表明, 干旱处理后转基因油菜根系的MDA含量显著高于J572。

我们测定了干旱处理后转基因油菜和对照J572油菜根系过氧化氢含量。结果表明, 干旱处理后油菜根系过氧化氢含量均高于未处理的材料, 其中J572油菜处理和未处理组间平均差异倍数约为2.41, 转基因油菜材料与未处理组间差异倍数大于4.54。未进行干旱处理的转基因材料与J572之间无显著差异, 干旱处理后的J572油菜材料中, 过氧化氢平均含量为 $1.33 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, 转基因油菜过氧化氢平均含量为 $2.28 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中OE-2过氧化氢含量3次重复平均值为 $2.54 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, 干旱处理后转基因油菜根系的过

氧化氢含量显著高于J572 (图6B)。上述结果表明, 相比野生型, *Bna-miR43*过表达植株受到了严重的氧化损伤。

2.7 *Bna-miR43*响应干旱胁迫的机制

由于*Bna-miR43*过表达株系对干旱敏感, 因此与对照J572相比, 过表达株系体内响应干旱的基因表达可能也会发生变化。我们选择氧化还原系统相关基因以及ABA信号通路基因进行表达量验证。荧光定量PCR结果显示, 氧化应激响应基因*GOX1*、*CAT1*和*SOD1*在过表达*Bna-miR43*油菜中表达量均显著降低; 与对照相比, 部分ABA信号通路上的基因表达水平升高 (图7)。这表明过表达*Bna-miR43*油菜对干旱敏感的表现与其体内氧化还原系统紊乱有关, 且过表达*Bna-miR43*油菜对干旱诱导的ABA途径基因表达较为敏感。

2.8 讨论

干旱是影响作物生产的主要环境胁迫因子, 可导致植物体内多种生理过程发生变化, 最终影响植物的生长发育 (An et al., 2019)。越来越多的研究表明, miRNA介导的基因调控在植物应对干旱胁迫过程中发挥关键作用 (Bai et al., 2018)。研究表明, miR167靶基因*ARFs*的启动子区域含有ABA响应元件ABREs, 拟南芥受到干旱胁迫后, miR167上调表达, 进而调节根系生长以适应干旱胁迫 (Xu et al., 1996; Wu et al., 2006; Liu et al., 2008)。干旱条件下, 玉米 (*Zea mays*) miR528表达下调, 靶基因*POD*的表达则上调, 促进玉米体内过量 H_2O_2 的清除 (Wei et al., 2009)。miR172通过靶向转录因子*AP2*调节水稻的衰老, 进而增强水稻对干旱胁迫的耐受性 (Nadarajah and Kumar, 2019)。本研究中, 为验证*Bna-miR43*是否受干旱胁迫诱导进而调控靶基因响应干旱, 对甘蓝型油菜J572进行干旱处理并检测*Bna-miR43*及其靶基因 (*BnaA09g03940D*和*BnaCnng24950D*)的表达量。发现干旱胁迫后*Bna-miR43*的表达量逐渐降低, 而*BnaA09g03940D*与*BnaCnng24950D*的表达量则逐渐升高。抗旱性越高的植物保水性越强, 其通过减少水分流失以避免干旱 (Zhao et al., 2017)。植物也会合成渗透性化合物, 降低细胞渗透压从而使植物保持较高的含水量 (Hu et al., 2015)。对过表达*Bna-miR43*

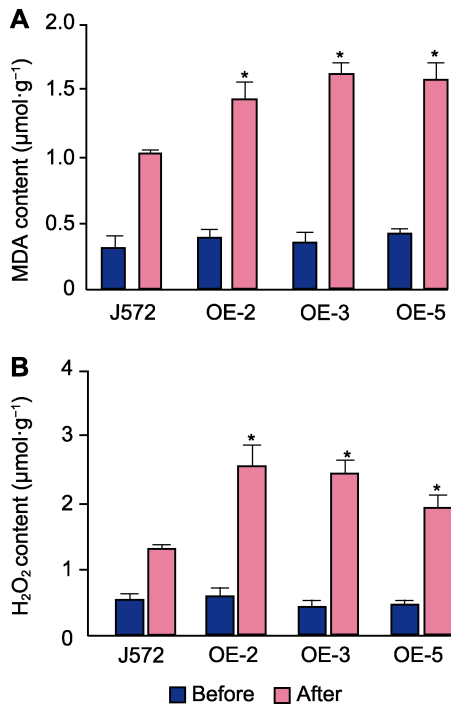


图6 过表达*Bna-miR43*油菜根系干旱胁迫后丙二醛(MDA) (A) 和过氧化氢(H_2O_2) (B) 含量分析

Before: 干旱胁迫处理前; After: 干旱胁迫处理后。实验设3次生物学重复。J572、OE-2、OE-3和OE-5同图5。* $P < 0.05$

Figure 6 Analysis of malondialdehyde (MDA) (A) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (B) content in roots of *Bna-miR43* overexpressed transgenic rapeseed after drought stress. Before: Before drought treatment; After: After drought treatment. Three biological replicates per experiment. J572, OE-2, OE-3, and OE-5 are the same as shown in Figure 5. * $P < 0.05$

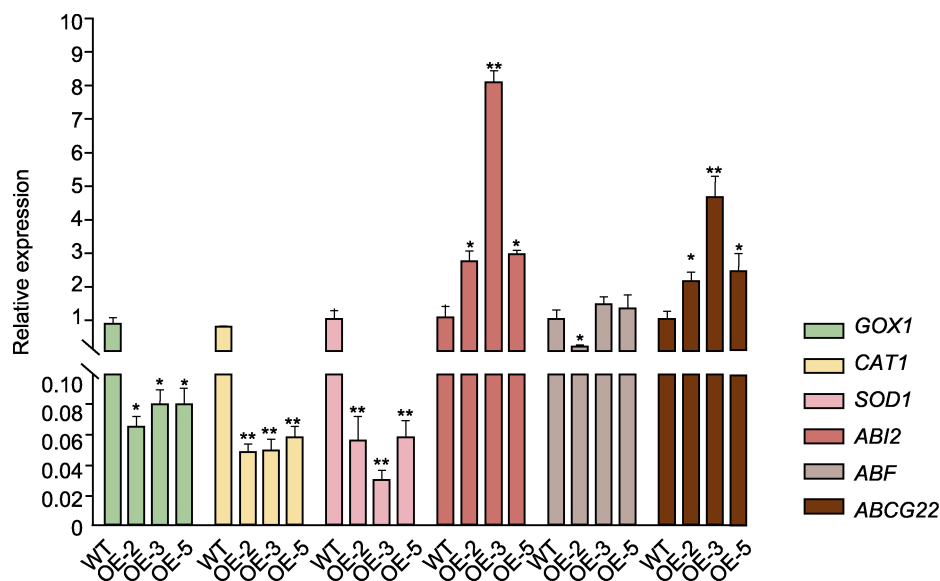


图7 过表达Bna-miR43油菜中氧化应激反应和ABA信号通路基因表达量分析

WT: 野生型; OE-2、OE-3和OE-5同图5。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Figure 7 Analysis of the expression of oxidative stress-responsive genes and genes involved in ABA signaling pathway in Bna-miR43 overexpressed transgenic rapeseed

WT: Wild type; OE-2, OE-3, and OE-5 are the same as shown in Figure 5. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

转基因阳性油菜进行干旱胁迫, 并对表型以及相关生理指标进行分析。结果表明, 过表达Bna-miR43使甘蓝型油菜对干旱的耐受能力下降。说明Bna-miR43响应干旱胁迫, 影响靶基因的表达量, 从而改变植物的抗旱性。

前人在小麦(*Triticum aestivum*)响应干旱胁迫研究中鉴定到1个正调控植物耐旱性的FBXL蛋白编码基因, 其通过增强植物的抗氧化能力参与干旱胁迫响应(Zhou et al., 2014)。拟南芥中, MAX2编码FBXL蛋白, 拟南芥max2突变体对干旱的耐受程度显著降低。与对照相比, 该突变体在受到干旱胁迫后体内与氧化应激反应相关的基因表达量均显著降低(Bu et al., 2014)。MAX2在苹果(*Malus pumila*)中的同源基因MdMAX2也可提高苹果的抗旱性(An et al., 2016)。本研究中, 对靶基因 *BnaA09g03940D* 和 *BnaCnng-24950D* 进行序列分析, 确定2个靶基因均编码FBXL蛋白家族。过表达Bna-miR43导致甘蓝型油菜对干旱极为敏感, 具体表现为转基因株系在干旱胁迫后严重失水, 其萎蔫程度较J572更严重。这与前人关于F-box蛋白调控植物响应干旱胁迫的表型一致。种子发芽需要适宜的水分、氧气以及温度。田间种子萌发

过程中经常遭遇干旱胁迫, 导致种子发芽率低, 幼苗生长不良, 进而导致减产(宋凝曦等, 2020)。过表达Bna-miR43的种子发芽率明显低于对照J572, 将导致油菜后期长势不佳。油菜在受到干旱胁迫后体内活性氧含量以及抗氧化酶含量均显著增加, 抗氧化酶可使体内的活性氧含量维持在相对稳定的水平, 从而缓解氧化损伤(Akram et al., 2018), 这与本研究结果一致, 对生理指标的分析表明, 转基因油菜和对照J572均因受到干旱胁迫导致体内的活性氧等增加。干旱胁迫后转基因株系的MDA和H₂O₂积累量显著高于对照J572, 即转基因植株受到的氧化胁迫更加严重, 这也是转基因植株长势较J572弱的原因之一。

此外, 在靶基因的启动子区域预测到最多的是MYB元件、茉莉酸甲酯响应元件和脱落酸响应元件, 表明靶基因可能受茉莉酸甲酯和脱落酸的诱导表达。植物中许多MYB基因的表达都受干旱调节。水稻幼苗发育时期受到干旱胁迫后, 体内65%的MYB基因发生差异性表达(Baldoni et al., 2015)。在拟南芥植株中过表达玉米MYB基因ZmMYB3R, 干旱胁迫后过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性升高, 对干旱的耐受性增强(Wu et al., 2019)。水稻

*OsMYB48-1*则可通过调节ABA的合成参与胁迫应答。与野生型相比,过表达植株在干旱条件下失水率较低,体内MDA含量较低而脯氨酸含量更高,以应对干旱胁迫(Xiong et al., 2014)。目前已鉴定到许多与植物耐旱相关的MYB转录因子。转录因子通过与靶基因启动子区域的特定顺式作用元件结合进而激活或抑制靶基因的转录,以参与植物的生长发育过程(王劲东等, 2020)。因此,推测MYB转录因子能够与靶基因互作,调节靶基因的表达以响应干旱胁迫。本实验室前期的研究发现, Bna-miR43能够增强甘蓝型油菜对Al³⁺的耐受性(张盈川等, 2022)。而在本研究中,过表达Bna-miR43则导致甘蓝型油菜对干旱胁迫的耐受性降低。

综上所述, Bna-miR43可以响应干旱胁迫。过表达Bna-miR43导致甘蓝型油菜体内不能产生较多的F-box蛋白,进而使甘蓝型油菜水分流失严重、抗氧化系统紊乱,对干旱胁迫更敏感。同时,基因表达量分析结果表明,过表达Bna-miR43导致的干旱敏感性可能与ABA信号通路相关。

参考文献

- 陈丽 (2018). 甘蓝型油菜株型及角果长度相关miRNA和靶基因的挖掘. 博士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 21–59.
- 宋凝曦, 谢寅峰, 李霞 (2020). 干旱胁迫下表观遗传机制对转C₄型PEPC基因水稻种子萌发的影响. 植物学报 **55**, 677–692.
- 王劲东, 周豫, 余佳雯, 范晓磊, 张昌泉, 李钱峰, 刘巧泉 (2020). MiR172-AP2模块调控植物生长发育及逆境响应的研究进展. 植物学报 **55**, 205–215.
- 吴丹丹, 陈永坤, 杨宇, 孔春艳, 龚明 (2021). 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族和相应miRNAs的鉴定及其对低温锻炼的响应. 植物学报 **56**, 544–558.
- 张盈川, 吴晓明玉, 陶保龙, 陈丽, 鲁海琴, 赵伦, 文静, 易斌, 涂金星, 傅廷株, 沈金雄 (2023). Bna-miR43-FBXL调控模块参与甘蓝型油菜铝胁迫的功能分析. 作物学报 **49**, 1211–1221.
- Akram NA, Iqbal M, Muhammad A, Ashraf M, Al-Qurainy F, Shafiq S (2018). Aminolevulinic acid and nitric oxide regulate oxidative defense and secondary metabolisms in canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. *Protoplasma* **255**, 163–174.
- An J, Li QX, Yang JJ, Zhang GQ, Zhao ZX, Wu YZ, Wang Y, Wang W (2019). Wheat F-box protein TaFBA1 positively regulates plant drought tolerance but negatively regulates stomatal closure. *Front Plant Sci* **10**, 1242.
- An JP, Rui L, Qu FJ, You CX, Wang XF, Hao YJ (2016). Apple F-Box protein MdMAX2 regulates plant photomorphogenesis and stress response. *Front Plant Sci* **7**, 1685.
- Bai QQ, Wang XY, Chen X, Shi GQ, Liu ZP, Guo CJ, Xiao K (2018). Wheat miRNA TaemiR408 acts as an essential mediator in plant tolerance to Pi deprivation and salt stress via modulating stress-associated physiological processes. *Front Plant Sci* **9**, 499.
- Baldoni E, Genga A, Cominelli E (2015). Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *Int J Mol Sci* **16**, 15811–15851.
- Batool T, Ali S, Seleiman MF, Naveed NH, Ali A, Ahmed K, Abid M, Rizwan M, Shahid MR, Alotaibi M, Al-Ashkar I, Mubushar M (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Sci Rep* **10**, 16975.
- Bu Q, Lv T, Shen H, Luong P, Wang J, Wang Z, Huang Z, Xiao L, Engineer C, Kim TH, Schroeder JI, Huq E (2014). Regulation of drought tolerance by the F-Box protein MAX2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **164**, 424–439.
- Danquah A, De Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv* **32**, 40–52.
- Hu Y, Wang B, Hu TX, Chen H, Li H, Zhang W, Zhong Y, Hu HL (2015). Combined action of an antioxidant defence system and osmolytes on drought tolerance and post-drought recovery of *Phoebe zhennan* S. Lee saplings. *Acta Physiol Plant* **37**, 84.
- Ji XM, Dong BD, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, Hughes T, White RG, Gubler F, Dolferus R (2011). Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiol* **156**, 647–662.
- Kaur G, Asthir B (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biol Plant* **61**, 201–209.
- Kim H, Lee K, Hwang H, Bhatnagar N, Kim DY, Yoon IS, Byun MO, Kim ST, Jung KH, Kim BG (2014). Overexpression of *PYL5* in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. *J Exp Bot* **65**, 453–464.
- Li WX, Oono Y, Zhu JH, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui XP, Jin HL, Zhu JK (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*

- 20, 2238–2251.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC** (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**, 836–843.
- Liu XY, Zhang XJ, Sun BC, Hao LY, Liu C, Zhang DF, Tang HJ, Li CH, Li YX, Shi YS, Xie XQ, Song YC, Wang TY, Li Y** (2019). Genome-wide identification and comparative analysis of drought-related microRNAs in two maize inbred lines with contrasting drought tolerance by deep sequencing. *PLoS One* **14**, e0219176.
- Nadarajah K, Kumar IS** (2019). Drought response in rice: the miRNA story. *Int J Mol Sci* **20**, 3766.
- Nadeem M, Li JJ, Yahya M, Sher A, Ma CX, Wang XB, Qiu LJ** (2019). Research progress and perspective on drought stress in legumes: a review. *Int J Mol Sci* **20**, 2541.
- Shah SMS, Ullah F** (2021). A comprehensive overview of miRNA targeting drought stress resistance in plants. *Braz J Biol* **83**, e242708.
- Wei LY, Zhang DF, Xiang F, Zhang ZX** (2009). Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *Int J Plant Sci* **170**, 979–989.
- Wu JD, Jiang YL, Liang YN, Chen L, Chen WJ, Cheng BJ** (2019). Expression of the maize MYB transcription factor ZmMYB3R enhances drought and salt stress tolerance in transgenic plants. *Plant Physiol Biochem* **137**, 179–188.
- Wu MF, Tian Q, Reed JW** (2006). *Arabidopsis microRNA-A167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **133**, 4211–4218.
- Xiong HY, Li JJ, Liu PL, Duan JZ, Zhao Y, Guo X, Li Y, Zhang HL, Ali J, Li ZC** (2014). Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PLoS One* **9**, e92913.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho THD, Wu R** (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* **110**, 249–257.
- Zhao ZX, Zhang GQ, Zhou SM, Ren YQ, Wang W** (2017). The improvement of salt tolerance in transgenic tobacco by overexpression of wheat F-box gene *TaFBA1*. *Plant Sci* **259**, 71–85.
- Zhou SM, Sun XD, Yin SH, Kong XZ, Zhou S, Xu Y, Luo Y, Wang W** (2014). The role of the F-box gene *TaFBA1* from wheat (*Triticum aestivum* L.) in drought tolerance. *Plant Physiol Biochem* **84**, 213–223.

Bna-miR43 Mediates the Response of Drought Tolerance in *Brassica napus*

Yingchuan Zhang¹, Xiaomingyu Wu¹, Baolong Tao¹, Li Chen^{1,2}, Haiqin Lu¹, Lun Zhao¹
Jing Wen¹, Bin Yi¹, Jinxing Tu¹, Tingdong Fu¹, Jinxiong Shen^{1*}

¹National Engineering Research Center of Rapeseed/National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

Abstract miRNAs are involved in plant growth and response to stress by regulating the expression of target genes. We conducted a functional study on a single miRNA identified by our group, Bna-miR43. The function of Bna-miR43 under drought stress was investigated by constructing a Bna-miR43 overexpression vector. Degradation group sequencing has predicted that the four target genes of Bna-miR43 belonged to the F-box protein family. Under simulated drought conditions, the expression of Bna-miR43 in J572 roots decreased gradually, while the expression pattern of target genes was shown to be opposite to that of Bna-miR43. With the increasing time of drought treatment, the expression of target genes increased gradually. Expression pattern analysis showed that Bna-miR43 could respond to drought stress by negatively regulating the expression of target genes. Transgenic experiment showed that under drought stress, the Bna-miR43 overexpressed lines were extremely sensitive to drought. It was shown that the germination rate of the overexpressed lines decreased significantly, the plant dehydration was serious, and more MDA and H₂O₂ were accumulated in the body. After drought treatment, three coding superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glycolate oxidase (GOX) were identified in the Bna-miR43 overexpressed lines, and their expressions were down-regulated in the Bna-miR43 overexpressed lines. The results showed that Bna-miR43 plays a key role in regulating plant drought tolerance by regulating the osmotic accumulation and ROS homeostasis in *Brassica napus*.

Key words *Brassica napus*, Bna-miR43, F-box, drought stress

Zhang YC, Wu XMY, Tao BL, Chen L, Lu HQ, Zhao L, Wen J, Yi B, Tu JX, Fu TD, Shen JX (2023). Bna-miR43 mediates the response of drought tolerance in *Brassica napus*. *Chin Bull Bot* 58, 701–711.

* Author for correspondence. E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)