

## 盐穗木*HcmiR172e*和预测的靶基因*HcTOE3*的克隆及盐胁迫下的靶向关系分析

张玉芳, 杨瑞瑞, 曾幼玲\*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐830046

**摘要:** 盐穗木(*Halostachys caspica*)广泛分布于新疆干旱盐碱地区, 属于藜科极端耐盐的盐生灌木。从600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理48 h的盐穗木根的小RNA文库中筛选到差异极显著的*HcmiR172e*做为研究对象, 利用盐穗木转录组数据预测其靶基因为*HcTOE3*, 开展*HcmiR172e-HcTOE3*的分子克隆和胁迫表达相关性工作。通过同源克隆和RACE技术获得盐穗木*HcmiR172e*前体和*HcTOE3*全长序列; 使用生物信息软件分析前体和靶基因信息及相关性; 采用qRT-PCR技术检测了不同盐浓度(200、400和600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)处理48 h的盐穗木*HcmiR172e*及预测的靶基因*HcTOE3*的表达变化。结果显示, 克隆得到的*HcmiR172e*前体序列可形成颈环结构, 各项指标符合前体要求。其靶基因*HcTOE3* cDNA全长为1 744 bp, 开放阅读框1 329 bp, 在编码区有一个高度匹配*HcmiR172e*的结合位点(CTGCAGCATCATCAGGATTC); qRT-PCR分析结果表明*HcmiR172e*与其预测的靶基因*HcTOE3*均响应盐的处理, 二者呈现一定的负相关性。后续将通过实验逐步阐明盐穗木*HcmiR172e*对*HcTOE3*在逆境中的靶向调控作用。

**关键词:** 盐穗木; 盐胁迫; *HcmiR172e*; *HcTOE3*; 克隆; qRT-PCR; 相关性

植物microRNA (miRNA)是一类长约21 nt的非编码RNA, 通过对靶mRNA的切割或翻译抑制来调节基因的表达(Cui等2014)。植物miRNA的靶基因大多为转录因子等具有调控功能的基因, 在植物生长发育进程及对多种胁迫应激反应中具有重要调节作用(Khraiwesh等2012)。

miR172是极度保守的一类miRNA, 最早在拟南芥中检测到, 随后在多种植物中也相继报道(Park等2002)。miR172可通过对靶mRNA的切割或翻译抑制来调控靶基因的表达, 其靶基因编码的蛋白为APETALA2 (AP2)及AP2-like的转录因子[TARGET OF EAT1-3 (TOE1-3)、SCHLAFMÜTZE (SMZ)和SCHNARCHZAPFEN (SNZ)] (Schwab等2005)。AP2是一类重要的与植物花发育相关的转录因子, 具有特殊的AP2结构域, 参与植物的生长发育及多种生理生化反应(Prunet等2015; Wuddineh等2015)。miR172通过调节其靶基因调控植物由营养生长到生殖生长的过渡。在拟南芥中除TOE3外, miR172的其他靶基因均能作为植物开花抑制子, 即过量表达这些靶基因能造成植物的开花延迟(Jung等2014)。而TOE3能影响花器官的形成, 但不能延迟植物的开花时间。在拟南芥多突变体(*ap2-12*、*toe1*、*toe2*、*toe3-1*、*smz*和*snz*)中, 与野生型植株相比, 突变体植株高产并且提前开花(Yant等2010)。miR172也响应多种逆境胁迫, 面包小麦经过干旱胁迫后, *miR172*相对表达量差异显著(Akdogan等

2015); 南瓜幼苗的*miR172*响应盐胁迫(Xie等2015); 大豆的*miR172c*可调节根瘤菌的侵染、根瘤器官的形成以及结节数量的控制(Wang等2014)等。

目前miRNA的研究主要在拟南芥、水稻和大豆等甜土植物中开展, 而在真盐生植物中鲜见报道。新疆具有丰富的盐生植物资源。盐穗木(*Halostachys caspica*)属藜科(Chenopodiaceae)盐穗木属, 是茎和叶高度肉质化的极端耐盐的多年生盐生灌木, 生长于干旱盐碱荒漠地区, 对盐分的适应性极强(Zeng等2015)。基于本课题组前期构建的高盐胁迫下盐穗木根的小RNA文库(Yang等2015), 本研究以受盐胁迫表达差异显著的*miR172e*及其预测的靶基因TOE3为研究对象, 利用同源克隆和RACE技术获得盐穗木*miR172e*前体(*pre-HcmiR172e*)序列和*HcTOE3*全长, 前体序列经Mfold生物软件预测可形成颈环二级结构, 靶基因编码的蛋白序列经BLAST同源比对, 与甜菜TOE3最为相似; 并通过qRT-PCR技术对盐胁迫下盐穗木*miR172e*和预测的靶基因TOE3进行了相关性分析, 后续将通过遗传转化拟南芥进一步解读盐穗木*miR172e-TOE3*的耐盐生物学功能和机制。

收稿 2016-02-26 修定 2016-03-28

资助 国家自然科学基金(31160186)、新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C274)和国家“973”计划前期研究专项(2012CB722204)。

\* 通讯作者(E-mail: zeng\_ylxju@126.com)。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

实验所用盐穗木[*Halostachys caspica* (Bieb.) C. A. Mey.]种子采集于古尔班通古特沙漠103团野外盐碱地(87.31°E, 44.29°N)。挑选籽粒饱满的种子播种于有基质(珍珠岩:蛭石:花土=1:1:2)的花盆中,采用室外自然光(16 h光照/8 h黑暗)、温度25~28°C的条件下培养90 d左右。将培养一致的盐穗木幼苗分为对照组和处理组(200、400和600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液),并给予相同水量淋浇处理,以保证植株各处理浓度稳定,48 h后,取其同化枝,每处理3份重复样品,液氮速冻并保存于-80°C冰箱。

### 2 实验方法

#### 2.1 盐穗木总RNA提取及cDNA合成

称取200 mg NaCl处理的盐穗木同化枝,利用植物总RNA提取试剂盒(DP432, Tiangen)和RNA-Free DNase I (D2270A, TaKaRa, Japan)的试剂盒操作说明提取植物总RNA。

按照SMARTer™ RACE cDNA扩增试剂盒(634923, Clontech)要求,以RNA为模板,反转录合

成5'-RACE-Ready-cDNA和3'-RACE-Ready-cDNA,用于靶基因RACE的克隆。根据M-MLV Reverse Transcriptase试剂盒(2641A, TaKaRa, Japan),采用Oligo(dT)引物反转录合成cDNA第一链,用于全长基因的克隆。按照SYBR® PrimeScript™ miRNA RT-PCR 试剂盒(RR716, TaKaRa, Japan)操作指南,以盐穗木总RNA为模板,利用poly A加尾法进行反转录合成cDNA,用于miRNA的qRT-PCR实验。

#### 2.2 HcmiR172e前体及靶基因HcTOE3的克隆

根据高盐胁迫盐穗木根的小RNA文库和转录组数据,候选了显著差异表达的*HcmiR172e*及预测的靶基因*HcTOE3*的EST序列。由miRBase数据库中不同物种[拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、大豆(*Glycine max*)、琴叶拟南芥(*Arabidopsis lyrata*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、木薯(*Manihot esculenta*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)]的*pre-miR172e*,设计同源克隆的前体引物(miR172e-F和miR172e-R)(表1),再由同源克隆获得的序列设计5'-RACE引物

表1 实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in the all experiments

名称	引物	引物序列(5'→3')
miR172e	miR172e-F	TGCAGATGCAGCATCATCAAGATTC
	miR172e-R	ATGCAGCATCATCAAGATTCCCA
	miR172e-5'RACE-GSP	AGGGGGCTTTAAGAAATAAATGTGGTTCC
	miR172e-5'RACE-NGSP	CTCAAGGAGAAGCGTAGGATGTG
	HcmiR172e-F ( <i>Kpn</i> I)	<u>GGTACCCCGCTGCAGCATCAT</u>
	HcmiR172e-R ( <i>Bam</i> HI)	<u>GGATCCATGCAGCATCATCAAG</u>
TOE3	HcTOE3 5'RACE-Outer	CGTGAGCTCCTTGCTGTTGGATT
	HcTOE3 5'RACE-Inner	ATGCACGACCACGACCATGATGA
	HcTOE3 3'RACE-Outer	ATGGTCGTGGTCGTGCATTC
	HcTOE3 3'RACE-Inner	GCATCATCAGGATTCCTTCAATC
	HcTOE3 ORF-F ( <i>Kpn</i> I)	<u>GGTACCATGTTGGATCTTAATCT</u>
	HcTOE3 ORF-R ( <i>Bam</i> HI)	<u>GGATCCTCAGTTAGATAAGTG</u>
	UPM (Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	UPM (Short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	qRT-PCR	RmiR172e
RHcTOE3-P1		AGGTTACCCTTCTGCCTGGAGT
RHcTOE3-P2		GCTGAAGAAGCAGTTGTGATTG
Hc5S-P1		ACCCGATCCCAATCCGAC
Hc5S-P2		TGTCTCCGAACAATCTCAGTAC
Hcβ-actin-P1		AAGATCTGGCACCACACCTTC
Hcβ-actin-P2		CACACCATCACAGAATCGA

(miR172e-5'RACE-GSP和miR172e-5'RACE-NG-SP), 以此精确获得*HcmiR172e*前体的5'端序列, 随后将*HcmiR172e*前体同源克隆片段与5'-RACE序列拼接获得该基因序列, 并以此序列设计特异性引物[*HcmiR172e*-F (*KpnI*)和*HcmiR172e*-R (*BamHI*)]; 以盐穗木cDNA为模板, PCR反应条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35个循环; 72°C 7 min。反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, PCR产物纯化回收后, 与pMD18-T (6011, TaKaRa, Japan)连接, 转化DH5 $\alpha$ , 经菌液PCR扩增鉴定正确后, 送上海生工生物工程股份有限公司测序。

根据盐穗木转录组中预测的靶基因*TOE3*的EST序列, 首先设计并利用5'-RACE引物(*HcTOE3* 5'RACE-Outer和*HcTOE3* 5'RACE-Inner), 3'-RACE引物(*HcTOE3* 3'RACE-Outer和*HcTOE3* 3'RACE-Inner)及试剂盒自带通用引物(NUP; UPM) (表1), 以5'-RACE-Ready-cDNA和3'-RACE-Ready-cDNA为模板进行PCR扩增, 获得3'-RACE末端及5'-RACE末端产物。PCR产物回收后, 经连接、转化, 鉴定正确后送上海生工生物工程股份有限公司测序。然后对靶基因*HcTOE3*的已知EST序列、5'-RACE和3'-RACE末端序列进行拼接, 获得该基因的电子拼接全长序列, 并以此设计扩增开放阅读框(ORF)的引物*HcTOE3* ORF-F (*KpnI*)和*HcTOE3* ORF-R (*BamHI*) (表1); 以盐穗木cDNA为模板, PCR反应条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35个循环; 72°C 7 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, PCR产物纯化回收后, 与pEASY-T1 (CT101, TransGen Biotech)连接, 转化DH5 $\alpha$ , 菌液PCR扩增鉴定正确后送测序。

### 2.3 *HcmiR172e*前体及*HcTOE3*基因结构与序列分析

使用Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>)在线软件对*HcmiR172e*前体二级结构预测。利用ExPASy ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html))预测*HcTOE3*蛋白的理化性质。利用NCBI CDD (Conserved Domain Database)在线数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析靶基因编码蛋白的保守结构域。利用MEGA5.0软件构建*HcmiR172e*和*HcTOE3*的系统进化树。

### 2.4 荧光定量检测盐胁迫下盐穗木*HcmiR172e*和*HcTOE3*的表达模式

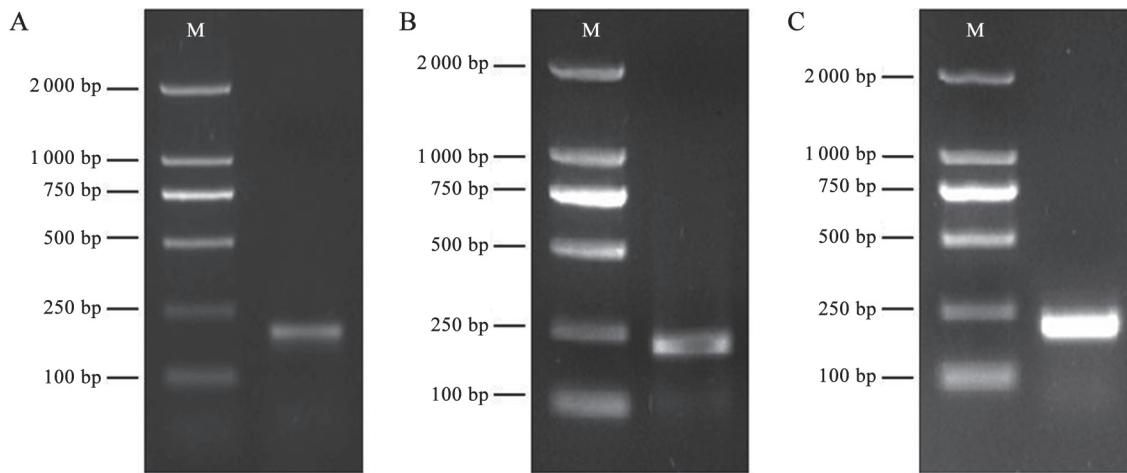
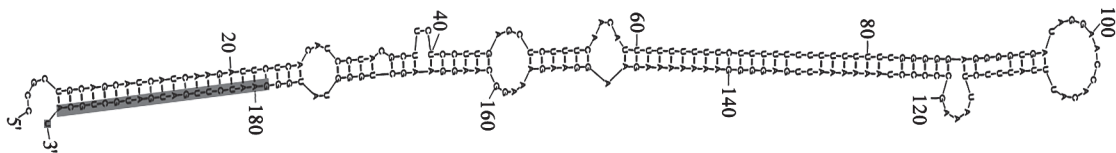
根据已知序列设计*HcmiR172e*引物(RmiR172e),

同时利用软件Primer Premier 5.0设计靶基因*HcTOE3*引物(RHcTOE3-P1和RHcTOE3-P2)。以M-MLV Reverse Transcriptase试剂盒和SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> miRNA RT-PCR Kit试剂盒反转录合成的cDNA为模板, *HcmiR172e*的表达量检测以*Hc5s-rRNA*为内参基因, *HcTOE3*的表达量检测以*Hc $\beta$ -actin*为内参基因, 使用ABI PRISM7500仪器实施各样本的荧光定量PCR。每样本进行3次生物学重复, 实验3次技术重复, 使用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法分析数据, 并利用软件Prism5.0作图分析*HcmiR172e*及靶基因*HcTOE3*的表达模式。

## 实验结果

### 1 盐穗木*HcmiR172e*前体克隆和二级结构预测

从本课题组已构建的高盐胁迫下盐穗木根的小RNA文库中, 筛选得到表达显著上调的*HcmiR172e*成熟体序列, 其前体经同源克隆获得200 bp序列, 5'-RACE巢式扩增获得210 bp片段, 再由二者拼接的序列设计特异性引物, 获得*pre-HcmiR172e* 198 bp序列(图1)。该前体序列中成熟体与文库中*HcmiR172e*成熟体一致, 利用Mfold软件预测该序列的二级结构, 能形成颈环结构(图2); 最小折叠自由能指数(MFEI)可从所有编码与非编码RNA中区分miRNA, 该值高于0.85时极有可能为miRNA, 扩增序列经计算MFEI值约为1.11 (表2); miRNA成熟体在颈环二级结构的一条臂上; miRNA成熟体和miRNA\*双链的非对称凸起尺寸小(1个或2个碱基), 频率少(1个或更少) (Meyers等2008)。综上, 获得的序列符合植物*pre-miRNA*的标准, 命名为*pre-HcmiR172e*。对miRBase中高梁(*SbimiR172e*)、玉米(*ZmamiR172e*)、毛果杨(*Ptc-miR172e*)、大豆(*GmamiR172e*)、可可树(*TccmiR-172e*)、油棕(*EgumiR172e*)、亚麻(*LusmiR172e*)、烟草(*NtamiR172e*)、苹果(*MdmmiR172e*)、香瓜(*CmamiR172e*)、木薯(*MesmiR172e*)与盐穗木*HcmiR172e*成熟体比对, 结果表明*miR172e*成熟体在不同物种中高度保守(图3)。通过MEGA5.0软件构建盐穗木*pre-HcmiR172e*系统进化树, 结果显示不同物种的*pre-miR172e*前体保守性不高(图4), 盐穗木与拟南芥的前体序列聚为一类, 二者进化关系较近。

图1 盐穗木*HcmiR172e*前体克隆Fig.1 PCR amplification of the *HcmiR172e* precursor gene from *H. caspica*A: *HcmiR172e*前体同源扩增; B: *HcmiR172e* 前体5'端扩增; C: *HcmiR172e*前体扩增; M: DL2000 Marker。图2 *HcmiR172e*前体颈环二级结构预测Fig.2 Predicted secondary structure of *HcmiR172e* precursor

图中灰色阴影为miRNA成熟体。

表2 预测的*pre-HcmiR172e*作为前体的各项指标Table 2 *HcmiR172e* potential precursor using Mfold software prediction

名称	指标
miRNA	<i>pre-HcmiR172e</i>
成熟体序列	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
成熟体长度/nt	20
前体长度/nt	198
GC/%	40.4
MEF	-88.6
MEFIs	1.11

盐穗木	<i>HcmiR172e</i>	. GAATCTTGATGATGCTGCAT ...
高粱	<i>SbimiR172e</i>	TGAATCTTGATGATGCTGCAC ...
玉米	<i>ZmamiR172e</i>	GGAATCTTGATGATGCTGCAT ...
毛果杨	<i>PtcmiR172e</i>	GGAATCTTGATGATGCTGCAT ...
大豆	<i>GmamiR172e</i>	GGAATCTTGATGATGCTGCAGCAG
可可树	<i>TccmiR172e</i>	AGAATCTTGATGATGCTGCAT ...
油棕	<i>EgumiR172e</i>	TGAATCTTGATGATGCTGCAC ...
亚麻	<i>LusmiR172e</i>	GGAATCTTGATGATGCTGCAG ...
烟草	<i>NtamiR172e</i>	AGAATCTTGATGATGCTGCAT ...
苹果	<i>MdmiR172e</i>	AGAATCTTGATGATGCTGCAT ...
西瓜	<i>CmamiR172e</i>	AGAATCTTGATGATGCTGCAG ...
木薯	<i>MesmiR172e</i>	GGAATCTTGATGATGCTGCAG ...

图3 盐穗木*HcmiR172e*成熟体与其他物种*miR172e*成熟体比对Fig.3 The multiple alignment of mature sequences of *miR172e* precursor between *H. caspica* and other plant species

## 2 *HcmiR172e*预测的靶基因*HcTOE3*的克隆和序列分析

### 2.1 盐穗木*HcTOE3*基因的克隆

*HcmiR172e*预测的靶基因是*HcTOE3*, 根据*HcTOE3* EST序列(323 bp), 分别设计了5'-RACE和3'-RACE巢式扩增引物, 并利用RACE技术获得了相应的5'-RACE (1 228 bp)和3'-RACE (372 bp)末端

(图5)。使用DNAMAN软件对*HcTOE3* EST序列和RACE技术扩增获得的序列进行拼接, 并以此序列设计扩增*HcTOE3*基因开放阅读框的特异性引物, 经PCR扩增获得预期大小的条带。测序正确后, 对该基因和编码蛋白进行生物信息学分析。

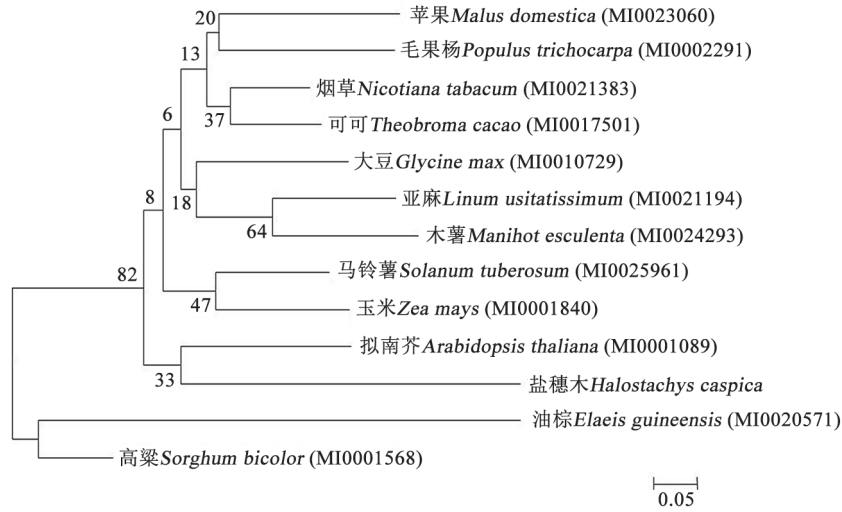


图4 不同植物*pre-miR172e*序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *miR172e* precursor sequences from different plant species

图中分支点的数字表示Bootstrap验证中基于1000次重复该节点可信度的百分比; 标尺代表遗传距离。

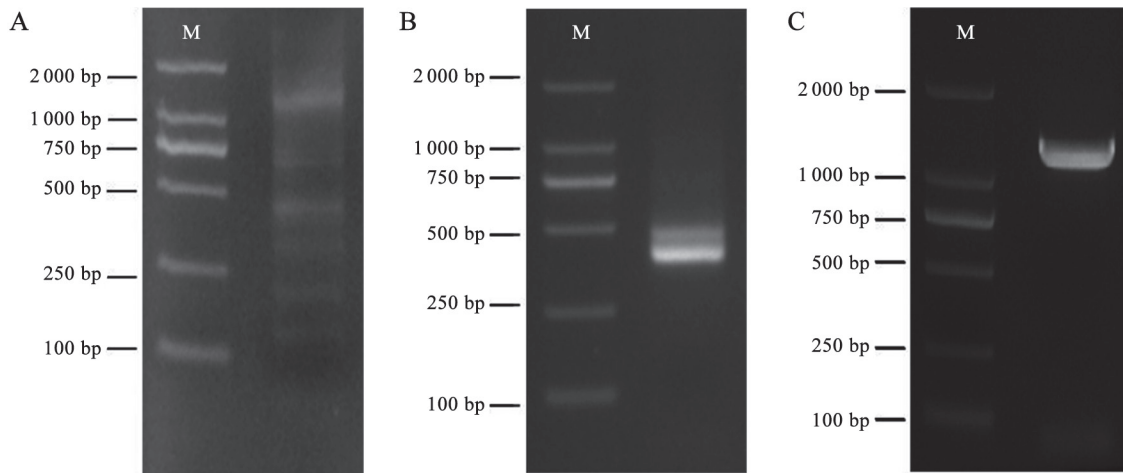


图5 盐穗木*HcTOE3*基因的扩增

Fig.5 PCR amplification of the *HcTOE3* gene from *H. caspica*

A: *HcTOE3* 5'端扩增; B: *HcTOE3* 3'端扩增; C: *HcTOE3* 开放阅读框扩增; M: DL2000 Marker。

## 2.2 盐穗木*HcTOE3*基因序列分析

通过生物信息学分析, *HcTOE3*的cDNA全长为1744 bp, 包含5'-UTR非编码区145 bp, 开放阅读框(ORF) 1329 bp, 3'-UTR非编码区270 bp, ORF编码442个氨基酸的蛋白质。通过在线软件EXPASy对*HcTOE3*基因编码蛋白的理化性质分析, 结果表明该蛋白的分子式为 $C_{2147}H_{3276}N_{620}O_{670}S_{11}$ , 理论分子量为48.8 kDa, 理论等电点为6.93, 脂肪系数为62.51, 不稳定系数是44.01, 为不稳定蛋白。同时,

利用NCBI在线保守结构域数据库(CDD)分析*HcTOE3*的保守结构域, 结果显示该蛋白属于AP2转录因子超家族成员(图6), 含有2个AP2结构域。AP2超家族是植物花发育中的一类重要参与因子, 在多种逆境胁迫中有重要作用, 可通过调节植物激素来应对生物和非生物胁迫, 这些植物激素包括乙烯(Zhang等2011)、脱落酸(Zhu等2010)、茉莉酸(Moffat等2012)、细胞分裂素(Zhao等2012)、赤霉素(Yaish等2010)和病原体感染(Lin等2007)等。

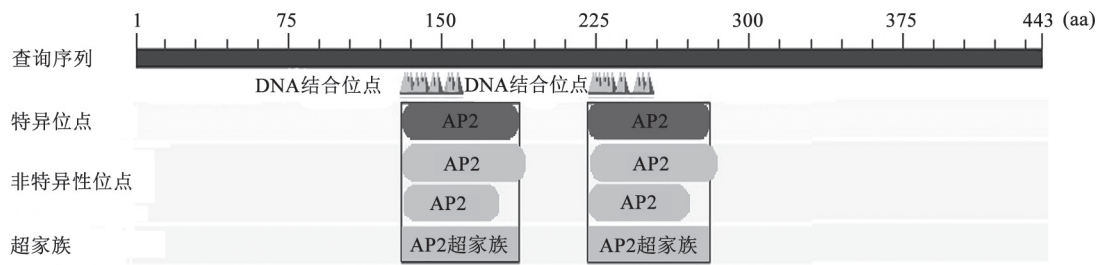


图6 盐穗木HcTOE3蛋白的保守结构域

Fig.6 Conserved domains of the HcTOE3 protein from *H. caspica*

通过MEGA5.0软件构建系统进化树,结果显示TOE3蛋白在番茄、巨桉、葡萄、粟、香蕉和油菜等不同物种中高度保守,并且HcTOE3与同为藜科植物的甜菜聚为一类(图7)。

### 3 HcmiR172e及靶基因HcTOE3的相关性分析

Aukerman和Sakai (2003)研究证实, miR172通过调节AP2类转录因子的表达参与植物花器官的形成及开花时间的调控。Jung等(2014)在拟南芥中验证,过表达*rTOE3* (抗*miR172*的TOE3过表达植物)与过表达*rAP2* (抗*miR172*的AP2过表达植物)植株表型相似, TOE3与AP2在植物花形成过程中有重要作用。Nova-Franco等(2015)研究大豆的*miR172c*与靶基因*AP2-1*表达呈现负相关,并且增加*miR172*的

表达量,可改进根系的生长,增加根瘤菌的感染率,增高早期结瘤表达量等。

植物miRNA与其靶基因的作用机制主要有2种:对靶基因mRNA的切割或对靶mRNA翻译的阻遏(Rhoades等2002)。根据盐穗木小RNA文库和转录组数据, *HcmiR172e*预测的靶基因为*HcTOE3*,该基因在靠近3'端的编码区位置存在*HcmiR172e*的靶位点(图8),表明其可能受*HcmiR172e*的调控。

利用qRT-PCR技术对盐穗木同化枝中*HcmiR172e*和*HcTOE3*基因表达模式进行分析,结果(图9)表明, *HcmiR172e*在200和400 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理时,表达显著下调,随后在600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫处理时的表达量上调接近对照水平;相应地,

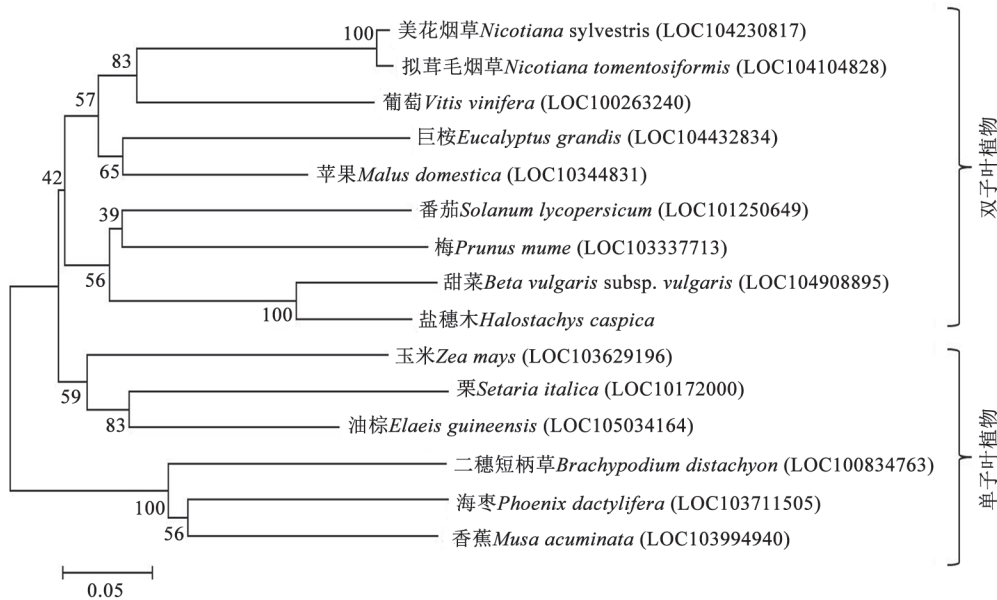


图7 不同植物TOE3氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.7 Phylogenetic tree of TOE3 amino acid sequences from different plant species

图中分支点的数字表示Bootstrap验证中基于1000次重复该节点可信度的百分比;标尺代表遗传距离。

```

HcmiR172e  20  UACGUCGUAGUAGUUCUAAG  1
              x | | | | | | | | | | 0 | | | |
HcTOE3     1252 CUGCAGCAUCAUCAGGAUUC 1272
    
```

图8 盐穗木*HcmiR172e*的靶基因预测

Fig.8 Predicted target gene of the *HcmiR172e* from the *H. caspica* transcriptome

图中字母X和O表示miRNA与预测靶基因靶位点间的碱基错配, X表示嘧啶之间或者嘌呤之间的错配, O表示嘧啶与嘌呤的错配。

*HcTOE3*在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理时的表达显著上调, 随着盐浓度的增加其表达量呈现下调趋势。盐穗木同化枝经不同NaCl浓度处理48 h后*HcmiR172e*与*HcTOE3*的表达量变化(图9), 与Nova-Franco等(2015)研究结果相似, miRNA与靶基因呈现负相关性, 表明*HcmiR172e*可能调节*HcTOE3*的表达量, 即*HcmiR172e*的靶基因可能为*HcTOE3*。

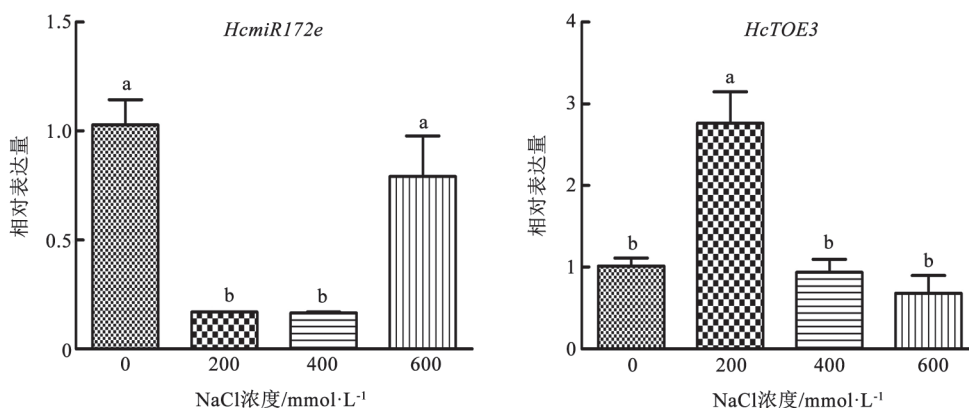


图9 盐穗木同化枝*HcmiR172e*和靶基因*HcTOE3*在不同盐浓度胁迫处理48 h的表达模式

Fig.9 Expression pattern of *HcmiR172e* and its target *HcTOE3* in *H. caspica* assimilating branches under different concentration NaCl treatment for 48 h

各柱形上不同小写字母表示*HcmiR172e*或*HcTOE3*不同处理间存在显著差异( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

植物在生长发育过程中, 常受到多种不利环境因素的影响, 而植物为固着生长无法逃避胁迫, 进而衍生出错综复杂的分子调控网络, 尤其是miRNA作为一类保守的内源性小RNA分子在此过程中起着重要调控作用(Ding等2008)。植物miRNA的靶基因大多为编码调控蛋白的转录因子, 因此miRNA与靶基因的靶向关系和调控机制对研究植物生长发育和应对胁迫至关重要。

miRNA172是极为保守的miRNA家族, 其靶基因已证实为AP2类转录因子(Chen 2004)。AP2是开花调控抑制子, 主要参与植物的生长发育, 如参与花器官、花序分生组织、胚珠及种子的形成(Irish 1998; Klucher等1996), 而在胁迫应答方面研究较少。盐穗木为荒漠盐碱植物, 对盐分的适应性极强, 是盐生植物群落的建群种、优势种或主要伴生种(郗金标等2006)。因此, 研究盐穗木miRNA的耐盐调控机制具有重要意义。

Frazier等(2011)研究烟草中miR172受盐胁迫诱导上调; Gupta等(2014)证实大麦的miR172响应盐胁迫, 表达上调。盐穗木*HcmiR172e*在200和400 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理时, 表达下调, 随后在600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫处理时表达上调, 且恢复至对照水平, 这可能与miRNA的调控具有物种、时空和浓度依赖有关(Wang等2013)。*HcTOE3*与*HcmiR172e*呈现相反的表达模式, 在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理诱导上调, 随着盐浓度的增加表达开始下调, 在600 mmol·L<sup>-1</sup>时表达量低于对照水平。

pre-miRNA在miRNA的功能研究中至关重要。目前, miRBase中的pre-miRNA以模式植物居多, 一般是通过实验方法(直接克隆、Northern杂交、PCR和/或5'-RACE)、计算方法预测或者EST(expressed sequence tag)分析获得前体序列(Zhang等2006)。如果未预测到该植物的miRNA前体, 则会有碍于miRNA的调控功能研究。本文通过同源克隆与5'-RACE技术得到盐穗木pre-*HcmiR172e*序

列,符合前体各项指标,有助于深入探讨*Hc-miR172e*的调控功能。

综上,盐穗木*miR172e-TOE3*的相关性研究有待进一步丰富和完善,如它们的靶向关系,*Hc-miR172e*在胁迫方面的调控功能和预测的靶基因*HcTOE3*响应盐胁迫的机制都需要实验验证来进一步阐明。目前,利用拟南芥转基因技术平台正在开展盐穗木*miR172e-TOE3*的耐盐调控研究,以期利用miRNA的生物技术提高农作物的抗性和产量。

### 参考文献

- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, Unver T (2015). miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct Integr Genomic*, doi: 10.1007/s10142-015-0452-1
- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell*, 15 (11): 2730–2741
- Chen XM (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303 (5666): 2022–2025
- Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX (2014). The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J*, 80 (6): 1108–1117
- Ding D, Zhang LF, Wang H, Liu ZJ, Zhang ZX, Zheng YL (2008). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Ann Bot*, 103 (1): 29–38
- Frazier TP, Sun GL, Burklew CE, Zhang BH (2011). Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Mol Biotechnol*, 49 (2): 159–165
- Gupta OP, Meena NL, Sharma I, Sharma P (2014). Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Mol Biol Rep*, 41 (7): 4623–4629
- Irish VF (1998). Floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 36 (1): 61–68
- Jung JH, Lee SM, Yun J, Lee MY, Park CM (2014). The miR172 target TOE3 represses *AGAMOUS* expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Sci*, 215–216 (2): 29–38
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu JH (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 137–148
- Klucher KM, Chow H, Reiser L, Fischer RL (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 8 (2): 137–153
- Lin RM, Zhao WS, Meng XB, Peng YL (2007). Molecular cloning and characterization of a rice gene encoding AP2/EREBP-type transcription factor and its expression in response to infection with blast fungus and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol*, 70 (1): 60–68
- Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao XF, Carrington JC, Chen X, Green PJ, et al (2008). Criteria for annotation of plant microRNAs. *Plant Cell*, 20 (12): 3186–3190.
- Moffat CS, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2012). ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 7 (4): e35995
- Nova-Franco B, Íñiguez LP, Valdés-López O, Alvarado-Affantranger X, Leija A, Fuentes SI, Ramírez M, Paul S, Reyes JL, Girard L, et al (2015). The micro-RNA172c-*APETALA2-1* node as a key regulator of the common bean-*Rhizobium elli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol*, 168 (1): 273–291
- Park W, Li JJ, Song RT, Messing JC, Chen XM (2002). CARPEL FACTORY, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 12 (17): 1484–1495
- Prunet N, Morel P, Champelovier P, Thierry AM, Negrutiu I, Jack T, Trehin C (2015). SQUINT promotes stem cell homeostasis and floral meristem termination in *Arabidopsis* through *APETALA2* and *CLAVATA* signalling. *J Exp Bot*, doi:10.1093/jxb/erv394
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110 (4): 513–520
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*, 8 (4): 517–527
- Wang M, Wang QL, Zhang BH (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530 (1): 26–32
- Wang YN, Wang LX, Zou YM, Chen L, Cai ZM, Zhang SL, Zhao F, Tian YP, Jiang Q, Ferguson BJ, et al (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate *ENOD40* expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, 26 (12): 4782–4801
- Wuddineh WA, Mazarei M, Turner GB, Sykes RW, Decker SR, Davis MF, Stewart CN Jr (2015). Identification and molecular characterization of the switchgrass AP2/ERF transcription factor superfamily, and overexpression of *PvERF001* for improvement of biomass characteristics for biofuel. *Front Bioeng Biotechnol*, 3: 101
- Xi JB, Zhang FS, Mao DR, Tian CY, Dong ZC, Wang KF (2006). Species diversity and distribution of halophytic vegetation in Xinjiang. *Sci Silv Sin*, 42 (10): 6–12 (in Chinese with English abstract) [郝金标, 张福锁, 毛达如, 田长彦, 董振成, 王开芳 (2006). 新疆盐生植物群落物种多样性及其分布规律的初步研究. *林业科学*, 42 (10): 6–12]
- Xie JJ, Lei B, Niu ML, Huang Y, Kong QS, Bie ZL (2015). High throughput sequencing of small RNAs in the two *Cucurbita* germplasm with different sodium accumulation patterns identifies novel microRNAs involved in salt stress response. *PLoS ONE*, 10 (5): e0127412
- Yaish MW, El-Kereamy A, Zhu T, Beatty PH, Good AG, Bi YM, Rothstein SJ (2010). The *APETALA-2*-like transcription factor OsAP2-39 controls key interactions between abscisic acid and gibberellin in rice. *PLoS Genet*, 6 (9): e1001098
- Yang RR, Zeng YL, Yi XY, Zhao LJ, Zhang YF (2015). Small RNA



- deep sequencing reveals the important role of microRNAs in the halophyte *Halostachys caspica*. *Plant Biotechnol J*, 13 (3): 395–408
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen XM, Schmid M (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*, 22 (7): 2156–2170
- Zeng YL, Li L, Yang RR, Yi XY, Zhang BH (2015). Contribution and distribution of inorganic ions and organic compounds to the osmotic adjustment in *Halostachys caspica* response to salt stress. *Sci Rep*, 5: 13639
- Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Mol Life Sci*, 63 (2): 246–254
- Zhang LX, Li ZF, Quan RD, Li GJ, Wang RG, Huang RF (2011). An AP2 domain-containing gene, *ESE1*, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 157 (2): 854–865
- Zhao L, Hao DQ, Chen LM, Lu QY, Zhang YW, Li YG, Duan YY, Li WB (2012). Roles for a soybean RAV-like orthologue in shoot regeneration and photoperiodicity inferred from transgenic plants. *J Exp Bot*, 63 (8): 3257–3270
- Zhu Q, Zhang JT, Gao XS, Tong JH, Xiao LT, Li WB, Zhang HX (2010). The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor *RAP2.6* participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 457 (1–2): 1–12

## Cloning, expression and correlated analysis of *HcmiR172e* with predicted target gene *HcTOE3* in *Halostachys caspica* under salt stress

ZHANG Yu-Fang, YANG Rui-Rui, ZENG You-Ling\*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

**Abstract:** *Halostachys caspica* as a salt-diluted short shrub belonging to the Chenopodiaceae is distributed widely in arid and saline-alkali region of Xinjiang and shows extremely salt-tolerant. A miRNA mature sequence (*HcmiR172e*) differentially expressed was candidate from the two small RNA libraries of the *H. caspica* roots established by 600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl treatment for 48 h and the target gene of *HcmiR172e* was predicted as *HcTOE3* using the *H. caspica* transcriptome data. The *HcmiR172e* precursor (*pre-HcmiR172e*) and the full length *HcTOE3* gene were obtained by homologous cloning and RACE technology. *pre-HcmiR172e* and *HcTOE3* were analyzed by using the bioinformatics software. The expression pattern of *HcmiR172e* and *HcTOE3* of the *H. caspica* assimilating under different concentration NaCl treatment was detected using qRT-PCR method. The results showed that the obtained *pre-HcmiR172e* sequence can form the stem-loop structure, and the indexes can meet the requirements of the precursor using the Mold biological software. The full length of *HcTOE3* gene was 1 744 bp, the open reading frame was 1 329 bp, and the highly binding site (CTGCAGCAT-CATCAGGATTC) of *HcmiR172e* was matched within the *HcTOE3* encoding region. qRT-PCR analysis showed that *HcmiR172e* and predicted target gene *HcTOE3* were responding to salt treatment and took on a negative correlation at a certain extend between *HcmiR172e* and *HcTOE3*. The regulated mechanism for a pair of the *miR172e-TOE3* in *H. caspica* under abiotic stress will be elucidated in the further experiments.

**Key words:** *Halostachys caspica*; salt stress; *HcmiR172e*; *HcTOE3*; cloning; qRT-PCR; correlation

Received 2016-02-26 Accepted 2016-03-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31160186), the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (Grant No. 2015211C274), and the “973” Pre-Research Program of the Ministry of Science and Technology, China (Grant No. 2012CB722204).

\*Corresponding author (E-mail: zeng\_ylxju@126.com).