

## 茄子 *miR171b* 在抵抗黄萎病菌侵染中的功能

陈敏 林元秘 朱文姣 杨清\*

南京农业大学 生命科学学院, 南京 210095

\*通讯作者, [qyang19@njau.edu.cn](mailto:qyang19@njau.edu.cn)

**摘要** *microRNA171b* (*miR171b*)是 miR171 家族的成员,在植物的生长发育、应答非生物胁迫和生物胁迫中发挥重要作用。为了揭示 *miR171b* 在茄子(*Solanum melongena*)应答黄萎病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)侵染过程中的功能,本研究以茄子栽培品种'苏琦 1号'为实验材料,克隆 *pri-miR171b* 基因并构建表达载体,通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化系统构建 *miR171b* 转基因茄子植株,并对其抗黄萎病能力进行评估分析。抗病性分析表明,与对照相比, *miR171b* 过表达株系对大丽轮枝菌侵染具有较强抗性,病情指数为 18.5,大约是对照的 1/3~1/2;而 *miR171b* 反义抑制株系对大丽轮枝菌侵染较为敏感,病情指数分别为 68.4 和 72.6,是对照的 1.5~1.6 倍。病原菌内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)定量分析显示, *miR171b* 过表达株系维管束组织中大丽轮枝菌的含量较对照显著降低,而 *miR171b* 反义抑制株系的菌含量显著增加( $P < 0.05$ )。抗氧化酶活性分析显示, *miR171b* 过表达株系中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)酶活性高于对照株系,而反义抑制株系则低于对照。上述结果表明 *miR171b* 参与了茄子对黄萎病的防卫过程,并起着正调控作用。本研究为茄子抗黄萎病育种提供了理论依据。

**关键词** 茄子; *miR171b*; 黄萎病; 功能分析

中图分类号 S532 文献标识码 A

## Function of Eggplant (*Solanum melongena*) *miR171b* in Resistance to *Verticillium dahliae* Infection

CHEN Min LIN Yuan-Mi ZHU Wen-Jiao YANG Qing\*

College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

\* Corresponding author, [qyang19@njau.edu.cn](mailto:qyang19@njau.edu.cn)

**Abstract** *microRNA171b* (*miR171b*) is a member of miR171 family and plays an important role in plant growth and development, response to abiotic and biological stresses. To reveal the function of *miR171b* in eggplant (*Solanum melongena*) response to *Verticillium dahliae*, using eggplant cultivar 'Suqi No. 1' as the test material in this study, the *pri-miR171b* gene was cloned and its expression vector was constructed. The *miR171b* transgenic eggplant plants were regenerated through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and analyzed their resistance to *Verticillium* wilt. The disease resistance analysis showed that the *miR171b* overexpression line was more resistant to the infection of *V. dahliae* with disease index of 18.5, which was about 1/3 to 1/2 of the control, while *miR171b* antisense inhibition lines were more sensible with disease index of 68.4 and 72.6, which were 1.5~1.6 times of the control. The quantitative analysis of pathogen internal transcribed spacer (ITS) showed that the content of *V. dahliae* in the vascular tissues of *miR171b*

overexpression line was significantly lower than that in the control ( $P < 0.05$ ), and its content in *miR171b* antisense lines was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Antioxidant enzyme activity analysis showed that the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) enzyme in *miR171b* overexpression line were higher than those in the control, while their activities were lower in the antisense lines than in the control. The above results showed that *miR171b* was involved in the defense process of eggplant against *Verticillium* wilt, and played a positive regulatory role. This study provides a theoretical basis for the breeding of eggplant cultivars with the *Verticillium* wilt resistance.

**Keywords** Eggplant; microRNA171b (*miR171b*); *Verticillium* wilt; Functional analysis

*microRNA171b* (*miR171b*) 是一类高度保守的 miRNA, 最早由 Llave (2002) 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现。miR171 家族存在于几乎所有主要的陆生植物中, 包括最古老的陆生植物苔藓 (AxteLL, Bowman, 2008)。植物中 miR171 家族成员数目因物种而异, 拟南芥中有 3 个成员, 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中有 5 个成员, 大豆 (*Glycine max*) 中有 21 个成员。与其他 miRNA 家族的成员类似, miR171 家族成员包含 1 个或多个核苷酸变异, 这种序列偏差导致某些 miR171 成员的目标特异性不同。大部分 miR171 成员可指导切割毛分生组织 (hairy meristem, HAM) 或结节信号通路 (nodulation signaling pathway, NSP) 中的结节信号通路 (nodulation signaling pathway, NSP) 中的 SCARECROW 蛋白 (Hendelman et al., 2016)。

*miR171b* 作为 miR171 家族成员, 在植物的生长发育、应答非生物胁迫和生物胁迫中具有重要作用。核桃 (*Juglans regia*) *jre-miR171b* 通过作用转录因子 SCARECROW-LIKE6 (SCL6) 来影响植物的开花 (Zhou et al., 2018)。玉米 (*Zea mays*) *zma-miR171b* 能够响应镉处理, 在玉米根中下调表达 (Gao et al., 2019)。拟南芥 *miR171b* 在高盐、寒冷和干旱条件下表达上调, 说明其可能参与非生物胁迫的调控 (Liu et al., 2008)。水稻 (*Oryza sativa*) *osa-miR171b* 的表达水平升高能够减轻水稻感染条纹病毒 (*Tenuivirus*) 的症状, 而反义抑制其表达则引起相反的结果, 这表明 *osa-miR171b* 参与了水稻对条纹病的防卫过程 (Tong et al., 2017)。

茄子 (*Solanum melongena*) 是一种重要的蔬菜, 具有很高的营养价值和药用价值 (王雨, 2017)。黄萎病是一种由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 引起的世界性土传植物维管束病害, 在茄子生产上该病害的发病率在 40%~50%, 严重时达 70% 以上, 甚至绝产, 对茄子的生产造成了严重影响 (王俊红,

2020)。

已有研究表明, miRNA 参与了茄子对黄萎病防卫过程, 在黄萎病菌侵染的茄子中, 发现有 33 个 miRNA 受黄萎病菌的诱导上调或下调表达 (Yang et al., 2013)。在对 *miR395* 过表达茄子植株的黄萎病抗性进行分析时发现, 接种大丽轮枝菌后, *miR395* 过表达茄子植株对于黄萎病菌更加敏感, 出现较高的发病率 (Mu et al., 2018)。在本课题组的前期工作中发现, *miR171b* 受黄萎病菌侵染诱导上调表达, 并通过降解组测序对其靶基因进行了鉴定, 但其功能尚未阐明, 本研究以茄子为材料, 通过遗传转化方法构建 *miR171b* 转基因株系, 分析其在茄子防卫反应中的表达模式分析和抗病性, 揭示 *miR171b* 在茄子黄萎病防卫中的功能, 以期为茄子黄萎病抗病育种基因资源和育种方案的制定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

茄子 (*Solanum melongena*) '苏琦 1 号' 是江苏省普遍种植的地方品种, 种子购自江苏省农科院。挑选颗粒饱满的茄子种子, 消毒后, 接种于含有 200 mg/L 头孢霉素 (cefotaxime, Cef) 的固体 MS 培养基中, 置于 2 000 lx, 28 °C、16 h 光照和 20 °C、8 h 黑暗的条件下培养。

质粒表达载体 pCAMBIA1305、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 为本实验室保存。pMD19-T 克隆载体购于南京擎科生物科技公司, 高保真酶 PrimeSTAR Max、DL2000 DNA Marker、TB Green Premix Ex Taq II、限制性内切酶 Bgl II 和 Spe I 均为 TaKaRa 公司 (北京) 产品, 2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix、反

转录试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶试剂盒购于百泰克公司(无锡),PCR引物合成由上海生物工程股份有限公司完成,DNA序列测定由南京擎科生物科技有限公司完成。

## 1.2 *Pri-miR171b*的克隆

将番茄(*Solanum lycopersicum*) *miR171b*前体序列在茄子基因组数据库(<http://eggplant-hq.cn/>)进行搜索,获得茄子 *miR171b*的前体序列,在其前体序列前后各取150 bp左右作为 *pri-miR171b*。参照茄子 *pri-miR171b*序列分别设计扩增引物 *Pri-miR171b-F*、*Pri-miR171b-R*和 *Pri-miR171b-anti-F*、*Pri-miR171b-anti-R*(表1),以茄子基因组DNA为模板,利用高保真酶 PrimeSTAR Max 分别进行 *pri-miR171b*的PCR扩增,反应体系:10  $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1  $\mu\text{L}$ ,DNA模板1  $\mu\text{L}$ ,PrimeSTAR Max Premix 12.5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件:98  $^{\circ}\text{C}$  2 min;98  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  15 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,35个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR产物经胶回收后,连接到pMD19-T载体上,然后转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,在含有Amp的LB平板上挑选单克隆后送南京擎科生物公司测序。

## 1.3 *miR171b*表达载体的构建

通过质粒提取试剂盒提取含目的基因的pMD19-T载体,在37  $^{\circ}\text{C}$ 下用限制性内切酶 *Bgl* II和 *Spe* I 分别对含有目的基因的pMD19-T载体和表达载体 pCAMBIA1305 酶切8 h。酶切产物经电泳和凝胶回收后,用T<sub>4</sub> DNA连接酶在16  $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,采用冻融法将获得带有目的基因的重组质粒转化到DH5 $\alpha$ 中,转化的DH5 $\alpha$ 在含有50 mg/L Kan的LB固体培养基上进行筛选,挑取阳性克隆进行PCR检测,反应体系:10  $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1  $\mu\text{L}$ ,DNA模板1  $\mu\text{L}$ ,2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix 10  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸120 s,30个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。从PCR阳性DH5 $\alpha$ 株系中提取重组质粒,通过冻融法将其转入农杆菌菌株GV3101中。

## 1.4 遗传转化

在茄子幼苗长至两叶期时,将叶片剪成边长0.2 cm的正方形,背面朝上放在预培养基(MS+2.5

mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-benzyl aminopurine, 6-BA)+0.5 mg/L 吲哚-3-乙酸(3-indoleacetic acid, IAA))培养2 d。然后用OD<sub>600</sub>=0.2~0.3的农杆菌菌液侵染外植体,然后将其置于共培养基(MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+0.1 mol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS))上,25  $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养2 d。接着将外植体转入愈伤诱导培养基(MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+200 mg/L Cef)上,培养6~7 d后转入芽分化培养基(MS+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+5 mg/L 潮霉素(hygromycin, Hyg)+200 mg/L Cef),期间每15 d更换1次芽分化培养基,当抗性芽长到约1~2 cm高时,将其转入生根培养基(1/2 MS+0.1 mg/L IAA+200 mg/L Cef)上进行生根培养,约4周左右苗的基部将出现不定根。将生根苗经炼苗后移栽到装有营养土:蛭石=2:1的盆钵中生长,茄子果实成熟后,将种子从茄子中取出并置于37  $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘干,放在4  $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。

## 1.5 PCR检测

根据目的基因和载体序列设计 *miR171b*的验证引物:*pri-171b-F*、*pri-171b反-F*、*1305-R*(表1),用SDS法分别提取转基因茄子植株和野生型植株的DNA,以DNA为模板分别进行目的基因片段的PCR扩增,反应体系为:10  $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1  $\mu\text{L}$ ,DNA模板1  $\mu\text{L}$ ,2 $\times$ Power Taq PCR Master-Mix 10  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,35个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。以野生型茄子作为阴性对照,含有目的基因的质粒作为阳性对照。

## 1.6 抗病性分析

茄子植株的大丽轮枝菌接种采用浸根法(Yang et al., 2013)。将带有3~4片真叶的T<sub>1</sub>代转基因和野生型茄子幼苗根部浸在浓度为5 $\times$ 10<sup>7</sup>个/mL的孢子悬浮液中,2 d后对植株的发病情况进行调查。实验包含过表达转基因材料、反义抑制转基因材料、转空载体对照材料和野生型对照材料4个处理,每个处理收获10个植株。

茄子植株发病情况调查使用5级分级标准(Liu et al., 2012)。0级:叶片上无病斑;1级:1~2片叶片出现萎凋;2级:3~5片叶片出现萎凋;3级:大部分叶片出现萎凋;4级:植株萎凋枯死或即将萎凋枯死。使用病情指数作为植株抗病能力的评价指

标,病情指数的计算参照 Liu 等(2012):

$$\text{病情指数} = \left( \frac{\sum (\text{病级株数} \times \text{病级})}{\text{株数总和} \times \text{发病最高级的代表数值}} \right) \times 100。$$

根据病情指数对植株抗病性进行评价,免疫(I):病情指数为0;高抗(HR):病情指数在15以下;抗病(R):病情指数在15~30;中抗(MR):病情指数在30~40;感病(S):病情指数在40~60;高感(HS):病情指数在60以上。

### 1.7 组织内病菌定量分析

参照 Pantelides 等(2010)的方法检测 T<sub>1</sub> 代转基因茄子植株和对照茄子植株维管束组织中的大丽轮枝菌含量,接种 2 d 后,截取茄子植株所有的地上部分,去掉叶片,用蒸馏水清洗干净后提取总 DNA。根据大丽轮枝菌 ITS 序列设计引物 ITS-F 和 ITS-R,以  $\alpha$ -*tublin* 作为内参基因(表 1),进行大丽轮枝菌 DNA 水平的 PCR 分析,PCR 反应体系为:TB Green Premix Ex Taq II 12.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游

引物各 1  $\mu$ L, cDNA 溶液 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 方法分析数据。实验包含过表达转基因材料、反义抑制转基因材料、转空载体对照材料和野生型对照材料 4 个处理,每个处理收获 3 个植株。

### 1.8 抗氧化性酶活性分析

参照李合生(2000)的方法提取大丽轮枝菌处理和未处理的转基因及野生型植株叶片的粗酶液,分别使用紫外分光光度计测定这些材料中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性(邹琦, 2000; 张宪政, 1994)。实验包含过表达转基因材料、反义抑制转基因材料、转空载体对照材料和野生型对照材料 4 个处理,每个处理收获 3 个植株,检测重复 3 次。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	用途 Application
Pri-miR171b-F	<u>GAAGATCTTCTACCCACGACTAGATAACCATC</u>	<i>miR171b</i> 初始转录本扩增
Pri-miR171b-R	<u>GGACTAGTGGATGCATCCTAGGTGTTACTGA</u>	Amplification of primary <i>miR171b</i>
Pri-miR171b-anti-F	<u>GGACTAGTCTACCCACGACTAGATAACCATC</u>	反义 <i>miR171b</i> 初始转录本扩增
Pri-miR171b-anti-R	<u>GAAGATCTGGATGCATCCTAGGTGTTACTGA</u>	Amplification of antisense primary <i>miR171b</i>
miR171b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG-	<i>miR171b</i> 成熟体逆转录
miR171b-F	GATACGAAGTGAT	Reverse transcription of <i>miR171b</i> mature
Uni-R	ATAATTTGAGCCGCGCCAAT	<i>miR171b</i> 定量 PCR
U6-F	GTGCAGGGTCCGAGGT	qRT-PCR of <i>miR171b</i>
U6-R	CGGGGACATCCGATAAAA	
qRT-SmNSP2-F	TTGACCAATTTCTCGATTTG	<i>SmNSP2</i> 定量 PCR
qRT-SmNSP2-R	TGGGTGCACTGGGTCTTCTG	qRT-PCR of <i>SmNSP2</i>
SmEF1a-F	AGTAGACGCGGGACTTCC	<i>SmNSP2</i> 的内参基因
SmEF1a-R	CCACACTTCTCATATTGCTGTCA	Reference gene of <i>SmNSP2</i>
ITS-F	ACCAGCATCACCATTCTTCAAAA	大丽轮枝菌定量 PCR
ITS-R	CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC	qRT-PCR of <i>Verticillium dahliae</i>
$\alpha$ - <i>tublin</i> -F	CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC	茄子总 DNA 内参基因
$\alpha$ - <i>tublin</i> -R	CCACCATCAAGACTAAGCG	Reference gene of total DNA of eggplants
pri-171b-F	AGAAGACCTCAGCAACTC	<i>miR171b</i> 转基因验证
pri-171b 反-F	CTGATCACCGCCATATCAAAGA	Verification of <i>miR171b</i> transgenic
1305-R	GGAAGAAGCGATATTGGTGAGG CCGTATGTTGCATCACCTTCAC	

下划线标注的部分为限制性内切酶位点

The underlined parts are restriction endonuclease sites

### 1.9 *miR171b*的qRT-PCR分析

分别于接种大丽轮枝菌0、6、12、24、48和72 h采集野生型茄子植株的叶片,于接种大丽轮枝菌0和48 h采集T<sub>0</sub>代转基因茄子的叶片和对照材料的叶片,置于液氮中速冻,-80 °C保存。

使用Trizol法提取各样品的总RNA。采用Steam-loop法设计*miR171b*成熟体反转录引物,用BioTeke super RT Kit反转录合成含*miR171b*成熟体的cDNA。根据*miR171b*成熟体序列设计特异引物*miR171b-F*和*Uni-R*,以*U6*为内参基因(表1)。qRT-PCR反应体系为:TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, 10 μmol/L上下游引物各1 μL, cDNA溶液2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件为95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C延伸15 s, 40个循环。采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>方法分析数据。

### 1.10 *SmNSP2*的qRT-PCR分析

RNA的提取方法同1.9,通过BioTeke super RT Kit(百泰克,北京)反转录合成茄子cDNA。根据茄子结节信号通道2(*Solanum melongena nodulation-signaling pathway 2*, *SmNSP2*)基因序列设计特异引物qRT-*SmNSP2-F*和qRT-*SmNSP2-R*(表1),以*SmEF-1a*为内参基因,qRT-PCR的反应体系为:TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, 10 μmol/L上下游引物各1 μL, cDNA溶液2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件为95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C延伸15 s, 40个循环。采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>方法分析数据。

### 1.11 数据统计分析

数据采用平均数±标准差表示,显著性分析采用SPSS 19.0进行*t*检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 大丽轮枝菌诱导下茄子*miR171b*的表达模式

采用qPCR的方法检测大丽轮枝菌处理后不同时间段茄子*miR171b*的表达情况。结果(图1)显示,茄子接种大丽轮枝菌后0~48 h,*miR171b*在茄子中的表达量逐渐升高,48 h后有所下降。

### 2.2 转*miR171b*基因茄子植株的获得

为了构建转*miR171b*基因的茄子植株,本研究首先从茄子中克隆了*pri-miR171b*序列,长度为

404 bp(图2A)。然后将*pri-miR171b*插入pCAM-BIA1305载体*Bgl* II和*Spe* I之间,获得pCAM-BIA1305-*pri-miR171b*过表达载体,经双酶切PCR验证及测序验证后,将重组质粒转化至农杆菌GV3101中(图2B)。反义抑制载体的构建步骤与过表达载体相同,将其上下游引物酶切位点互换后,反向连接到表达载体pCambia1305上。

采用根癌农杆菌介导的遗传转化方法,将*pri-miR171b*转入茄子植株中,外植体经过愈伤培养、生芽、生根和Hyg筛选,获得了3株Hyg阳性过表达植株和4株反义抑制植株(图2C;2D)。采用半基因半载体的方法对获得的再生植株进行PCR鉴定,在*miR171b*过表达阳性植株中发现有1株含有目的基因和pCambia1305载体的DNA片段(图3A),在*miR171b*反义抑制阳性植株中有2株鉴定到目的条带(图3B)。进一步对获得的3个转基因株系进行了qRT-PCR分析,结果显示,在正常情况下,过表达株系中*miR171b*的表达水平显著高于对照( $P < 0.05$ ),反义抑制株系中的*miR171b*表达水平低于对照。在受到大丽轮枝菌侵染的情况下,所有处理的*miR171b*表达水平均有所上升,且过表达株系中*miR171b*表达量显著高于对照( $P < 0.05$ ),反义抑制株系中*miR171b*表达水平低于对照(图3C),说明*miR171b*不仅整合进转基因茄子植株的基因组中,而且能够正常的表达。

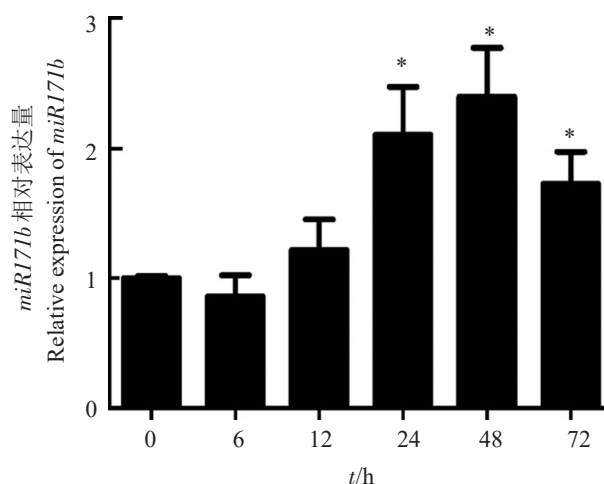


图1 大丽轮枝菌胁迫下茄子*miR171b*的表达分析

Figure 1 Expression analysis of eggplant *miR171b* under the stress of *Verticillium dahliae*

\*: 处理前后的*miR171b*表达水平差异显著( $P < 0.05$ )

\*: The expression of *miR171b* before treatment was significantly different from that after treatment ( $P < 0.05$ )

### 2.3 转基因株系的抗病性分析

采用浸根法检测了 *miR171b* 转基因株系的抗病能力,结果显示, *miR171b* 过表达植株与黄萎病菌侵染前,没有出现明显的表型变化;而 *miR171b* 反义植株对黄萎病菌侵染较为敏感,叶片出现了脱水和萎蔫的病症(图4A)。

病情指数分析显示(图4B),野生型植株为45.1,转1305空载体植株为48.3,OE-1过表达株系

为18.5,约为对照的1/2~1/3;而AE-1株系为68.4,AE-2株系为72.6,是对照的1.5~1.6倍。结果表明, *miR171b* 的表达提高了转基因茄子植株的黄萎病抗性。

### 2.4 转基因株系体内病原菌定量分析

植株体内的病原菌含量是植株抗病能力的一个指标。为了确定转基因植株体内病原菌的繁殖量,本研究对转基因植株内大丽轮枝菌的ITS序列

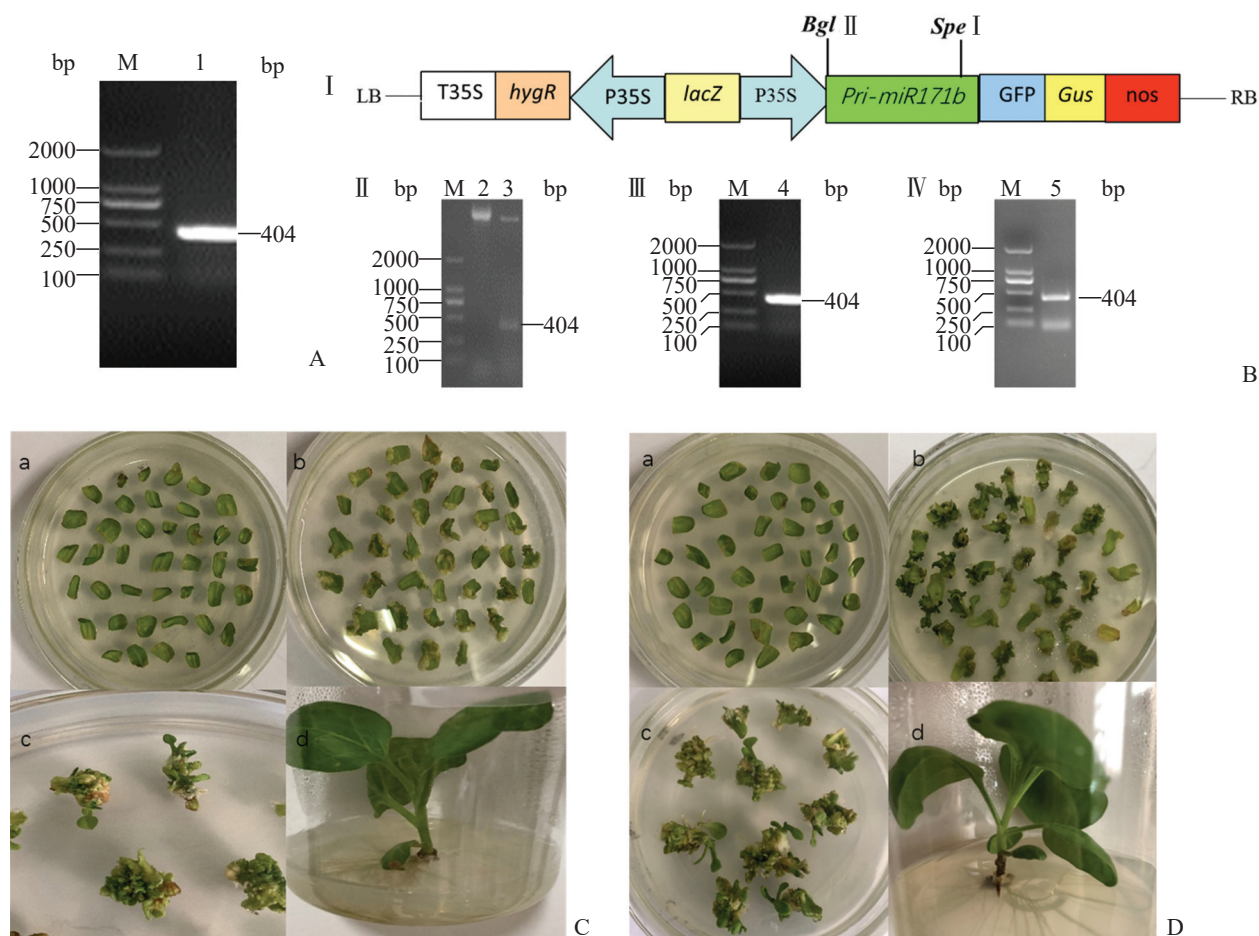


图2 *pri-miR171b* 的克隆、载体构建、转基因植株的获得

Figure 2 Cloning of *pri-miR171b*, vector construction, regeneration and identification of transgenic plants

A. *pri-miR171b* 扩增产物的凝胶电泳。B. *miR171b* 过表达载体的构建: I -载体结构; II -酶切验证; III -大肠杆菌菌液 PCR 验证及 IV -农杆菌菌液 PCR 验证。M: DL2000 DNA Marker; 1: *pri-miR171b* 基因; 2: 1305 质粒酶切; 3: pCambia1305-*pri-miR171b* 酶切; 4, 5: *pri-miR171b* 基因电泳条带。C. *miR171b* 过表达植株的再生。D. *miR171b* 反义抑制植株的再生。a: 预培养; b: 愈伤形成; c: 芽分化; d: 生根

A. Agarose gel electrophoresis of *pri-miR171b* amplification product. B. Construction of *miR171b* overexpression vector: I - Structure of the vector; II - Enzyme digestion verification; III - PCR identification of recombinant plasmid in transformed *E. coli*; IV - PCR identification of recombinant plasmid in transformed *Agrobacterium*; M: DL2000 DNA Marker; 1: *pri-miR171b*; 2: Enzyme digestion of pCambia1305; 3: Enzyme digestion of pCambia1305-*pri-miR171b*; 4, 5: *pri-miR171b* electrophoresis band. C. Regeneration of *miR171b* overexpression eggplant. D. Regeneration of *miR171b* antisense eggplant. a: Pre-culture; b: Callus formation; c: Shoot formation; d: Root formation



2016)。文心兰 (*Oncidium hybridum*) 可通过升高 *miR171a* 的表达水平来加强其抗软腐病的防卫过程(王培育, 2018)。黄瓜 (*Cucumis sativus*) 在受到白粉病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*) 侵染时, *csa-miR171k*、*csa-miR171f* 和 *csa-miR171g* 的每百万条读取的转录本(transcripts per million reads, TPM)显著升高(仲彩莲, 2020)。这说明包括 *miR171b* 在内的 *miR171* 家族成员能够参与植物的防卫反应。在本课题组前期实验中发现, 大丽轮枝菌的处理可诱导茄子中 *miR171b* 的表达水平上调, 推测 *miR171b* 可能参与了茄子对黄萎病的防卫过程。为了验证这一假设, 本研究构建了转基因材料, 并通过抗病性分析、病原菌定量和抗氧化酶活性测定, 对转基因植株的抗黄萎病能力进行了评估。已有研究表明, 病情指数与植株的抗病能力负相关(Liu et al., 2012)。经过大丽轮枝菌处理后, 茄子的病情指数越高, 表明茄子植株更易感病(Lan et al., 2017)。本研究对 *miR171b* 转基因植株病情指数统计发现, 过表达 *miR171b* 显著降低了转基因茄子植株的病情指数, 增强了抗黄萎病能力, 而反义抑制 *miR171b* 的表达结果则相反。 *miR171b* 反义转基因植株对

黄萎病菌的侵染变得敏感。植物体内的病原菌定植数目是植株抗病能力的一个指标(Häffner et al., 2014), 对转基因茄子体内的大丽轮枝菌数目进行检测发现, 过表达株系较野生型植株中病菌数目减少, 而反义抑制植株中的病菌数目增加, 这表明 *miR171b* 的表达对大丽轮枝菌的增殖具有抑制作用。活性氧(reactive oxygen species, ROS)的增加通常出现在病原体感染早期, 能够引起膜脂过氧化,

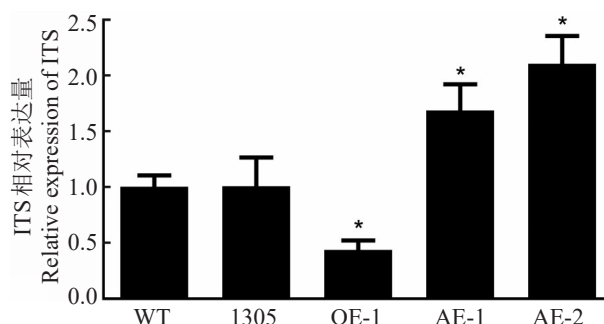


图5 *miR171b* 转基因植株中大丽轮枝菌繁殖量 qRT-PCR 分析

Figure 5 qRT-PCR analysis of fungal colonization by comparing *Verticillium dahliae* internal transcribed spacer (ITS) transcript levels in transgenic eggplant of *miR171b*

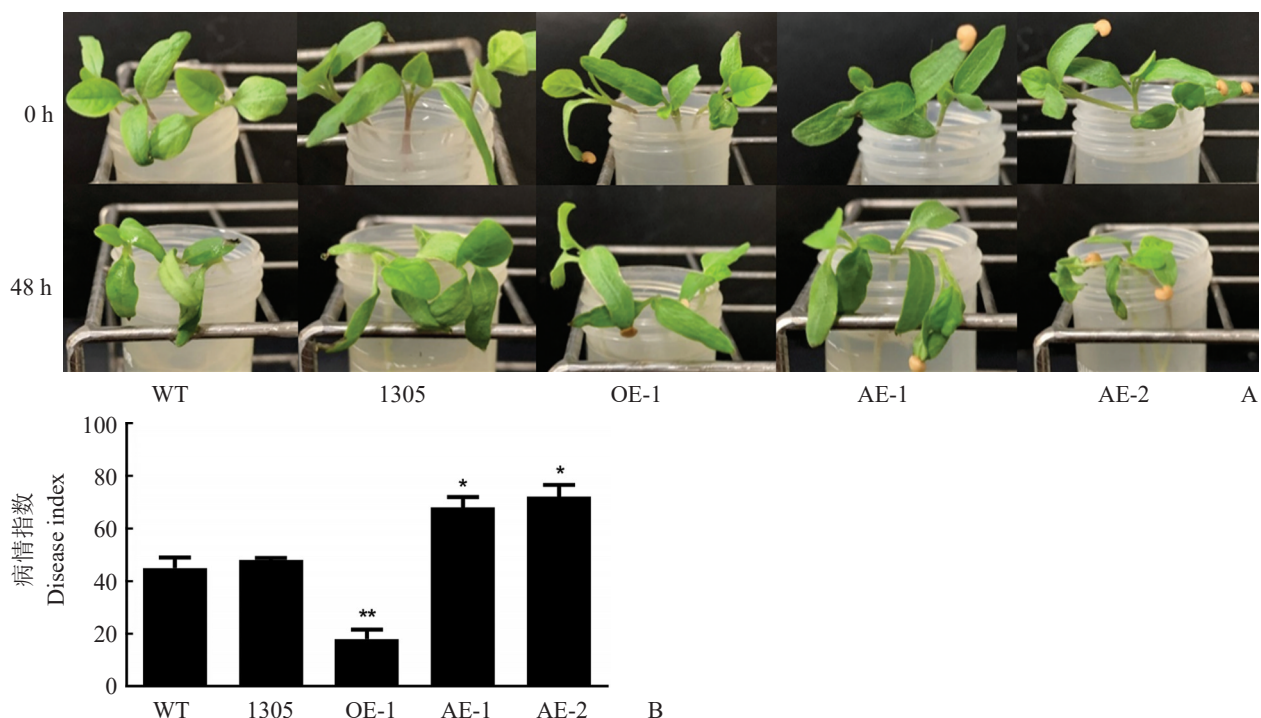


图4 大丽轮枝菌侵染后转基因及野生型茄子的抗病性分析

Figure 4 Analysis of the resistance of transgenic eggplants and wild-type eggplants after *Verticillium dahliae* inoculation

A. 表型. B. 病情指数

A. The phenotype. B. Disease index

从而导致疾病增加和酚类底物被氧化导致的酶促褐变(Sun et al., 2010; Lin et al., 2013),因此ROS清除酶在保护细胞免受氧化应激方面发挥着至关重要的作用(Chen et al., 2019)。本研究检测表明,与野生型对照相比, *miR171b* 过表达株系中SOD、POD和CAT抗氧化酶活性升高,反义抑制株系中

酶活性下降,SOD、POD和CAT活性的升高能有效帮助植物应对病原菌的侵染(Wang et al., 2018)。以上结果一致表明, *miR171b* 参与了茄子对黄萎病的防卫过程并起着正调控作用。

在植物上,miRNA通过剪切方式实现对其靶mRNA的调控,因此,在表达水平上,miRNA与靶

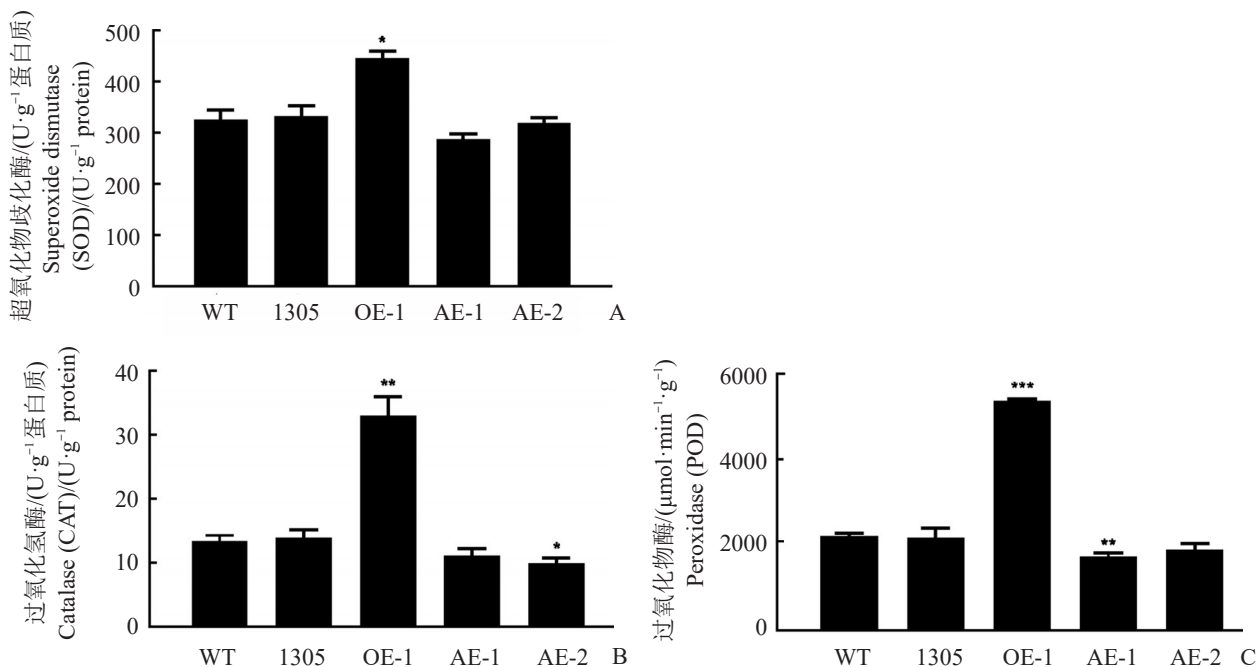


图6 *miR171b* 转基因茄子植株及对照中抗氧化酶酶活测定

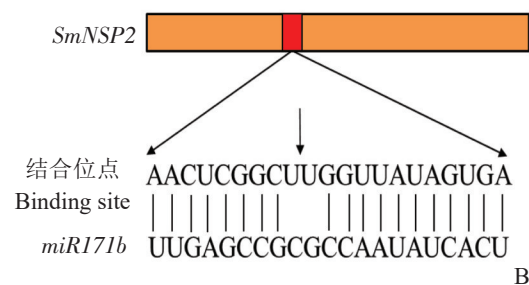
Figure 6 Analysis on the activities of antioxidant enzymes in *miR171b* transgenic eggplant and the control

A. 超氧化物歧化酶。B. 过氧化物酶。C. 过氧化氢酶。\*\*\*: 转基因植株与野生型相比, 差异极其显著( $P < 0.001$ )

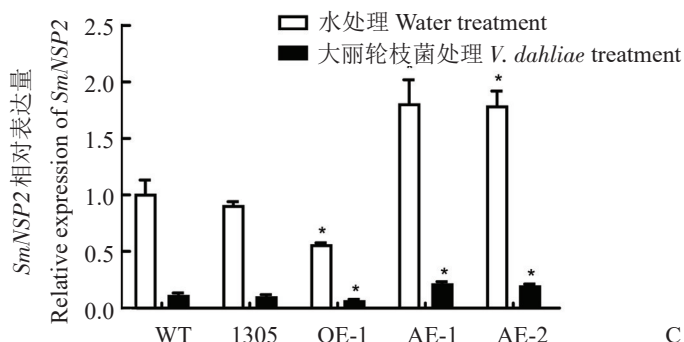
A. SOD. B. POD. C. CAT. \*\*\*: Very extremely significant difference between transgenic plants and wild type ( $P < 0.001$ )

小分子核糖核酸	转录本	比对范围/位	切割位点	处理的TPB/条	对照的TPB/条
MiRNA	Transcript	Alignment range	Cleavage site	TR_TPB	CK_TPB
<i>miR171b</i>	Sme2.5_4424.1_g00001.1	393~413	404	354.88	85.15

A



B



C

图7 *miR171b* 靶基因 *SmNSP2* 的分析及其在大丽轮枝菌胁迫下的表达分析

Figure 7 Analysis of *miR171b* target *SmNSP2* and its expression analysis under *Verticillium dahliae* stress

A. *SmNSP2* 切割结果。B. *SmNSP2* 切割位点。C. 转基因植株中 *SmNSP2* 的表达分析

A. Cleavage result of *SmNSP2*. B. Cleavage site of *SmNSP2*. C. Expression analysis of *SmNSP2* in transgenic plants

基因之间存在一种负反馈的调节机制(Reinhart et al., 2000)。通过荧光定量PCR分析发现, *miR171b* 转基因植株中 *SmNSP2* 表达量变化与 *miR171b* 表达量变化确实呈现相反的趋势, 说明茄子体内的 *SmNSP2* 作为 *miR171b* 的靶基因确实受到其负反馈调节。研究表明, *NSP1* 和 *NSP2* 能调节与独角金内酯生物合成相关的基因表达, 从而影响由独角金内酯或其他衍生化合物(如某些类胡萝卜素)介导的菌根化过程。进一步研究发现, 在根际信号独角金内酯的作用下, 能够加强植物与真菌的共生, 在真菌根定植中扮演了重要的角色(Gobbato et al., 2012)。本研究中大丽轮枝菌作为土传性真菌, 同样通过定植植物体根部, 释放毒素穿透植物根部的表面, 进入植物体内。因此, 结合 *miR171b* 的抗黄萎病研究结果, 推测茄子通过诱导 *miR171b* 表达, 使得根部 *SmNSP2* 含量降低, 可能有利于阻止大丽轮枝菌在体内的定植。

#### 4 结论

本研究从茄子中克隆了 *miR171b* 基因, 通过遗传转化和抗病性分析, 揭示其在茄子黄萎病防卫过程中的正调控作用, 并对其调控的靶基因 *SmNSP2* 进行了初步分析。本研究的结果, 在理论上为 *miR171b* 生物学功能研究注入新的见解, 在实践中为茄子黄萎病抗病育种基因资源和育种方案的制定提供理论依据。

#### 参考文献

李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 高等教育出版社, 北京. pp. 164-165. (Li H S. 2000. Experimental Principles and Techniques of Plant Physiology and Biochemistry[M]. Higher Education Press, Beijing. pp. 164-165.)

王俊红. 2020. 茄子黄萎病的防治现状及对策[J]. 中国果菜, 40(3): 98-100. (Wang J H. 2020. The control status and countermeasures of eggplant *Verticillium wilt*[J]. China Fruits and Vegetables, 40(3): 98-100.)

王培育. 2018. 文心兰 miRNA 在生长发育及抗软腐病中的应用研究[D]. 硕士学位论文, 福建农林大学, 导师: 林玉玲, pp. 22-24. (Wang P Y. 2018. Application of *oncidium hybridum* miRNA in growth and development and resistance to soft rot[D]. Thesis for M. S., Fujian Agriculture and Forestry University, Supervisor: Lin Y L, pp. 22-24.)

王雨. 2017. 传统农业时期茄在中国的栽培史研究[D]. 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 丁晓蕾, pp. 1-2. (Wang Y. 2017. Research on the history of eggplant cultivation in China during the traditional agricultural period[D]. Thesis for M. S., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Ding X L, pp. 1-2.)

张宪政. 1994. 植物生理学实验技术[M]. 辽宁科学技术出版社, 沈阳. pp. 99-100. (Zhang X Z. 1994. Experimental Technology of Plant Physiology[M]. Liaoning Science and Technology Press, Shenyang. pp. 99-100.)

仲彩莲. 2020. 黄瓜抗白粉病 miRNAs 的鉴定及功能分析[D]. 硕士学位论文, 扬州大学, 导师: 陈学好, pp. 13-17. (Zhong C L. 2020. Identification and functional analysis of cucumber powdery mildew miRNAs[D]. Thesis for M. S., Yangzhou University, Supervisor: Chen X H, pp. 13-17.)

邹琦. 2000. 植物生理学实验指导[M]. 中国农业出版社, 北京. pp. 161-162. (Zou Q. 2000. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. China Agricultural Press, Beijing. pp. 161-162.)

Axtell M J, Bowman J L. 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets[J]. Trends in Plant Science, 13(7): 343-349.

Chen Y, Hung Y C, Chen M, et al. 2019. Enhanced storability of blueberries by acidic electrolyzed oxidizing water application may be mediated by regulating ROS metabolism[J]. Food Chemistry, 270: 229-235.

Gao J, Luo M, Peng H, et al. 2019. Characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in maize (*Zea mays*) roots[J]. BMC Molecular Biology, 20(14): 1-9

Gobbato E, Marsh J, Vernié T, et al. 2012. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling[J]. Current Biology, 22(23): 2236-2241.

Häffner E, Karlovsky P, Splivallo R, et al. 2014. ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*[J]. BMC Plant Biology, 14(85):1-16.

Hendelman A, Kravchik M, Stav R, et al. 2016. Tomato HAIRY MERISTEM genes are involved in meristem maintenance and compound leaf morphogenesis[J]. Journal of Experimental Botany, 67(21): 6187-6200.

Lan X J, Zhang J, Zong Z F, et al. 2017. Evaluation of the bio-control potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in eggplant[J]. BioMed Research International, 2017(2): 1-8.

Lin Y F, Hu Y H, Lin H T, et al. 2013. Inhibitory effects of

- propyl gallate on tyrosinase and its application in controlling pericarp browning of harvested longan fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(11): 2889-2895.
- Liu H H, Tian X, Li Y J, et al. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. A RNA Publication of the RNA Society, 14(5): 836-843.
- Liu S P, Zhu Y P, Xie C, et al. 2012. Transgenic potato plants expressing *StoVe1* exhibit enhanced resistance to *Verticillium dahliae*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 30(4), 1032-1039.
- Llave C. 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants[J]. Plant Cell, 14(7): 1605-1619.
- Mishra A K, Duraisamy G S, Matoušek J, et al. 2016. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) infection [J]. BMC Genomics, 17(919): 1-19.
- Mu X Y, Liu X R, Cai J H, et al. 2018. MiR395 overexpression increases eggplant sensibility to *Verticillium dahliae* infection[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 65(2): 203-210.
- Pantelides I S, Tjamos S E, Paplomatas E J. 2010. Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*[J]. Molecular Plant Pathology, 11(2): 191-202.
- Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 403(6772): 901-906.
- Sun J, Zhang E, Xu L X, et al. 2010. Comparison on characterization of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(18): 10195-10201.
- Tong A, Quan Y, Shu W, et al. 2017. Altered accumulation of osa-miR171b contributes to *Rice stripe virus* infection by regulating disease symptoms[J]. Journal of Experimental Botany, 68(15): 4357-4367.
- Wang H, Chen Y, Lin H, et al. 2018. Phomopsis longanae chi-Induced change in ROS metabolism and its relation to pericarp browning and disease development of harvested longan fruit[J]. Front Microbiol, 9(2466): 1-8.
- Yang L, Jue D W, Li W, et al. 2013. Identification of miRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* infection[J]. PLOS ONE, 8(8): e72840.
- Zhou L, Quan S, Xu H, et al. 2018. Identification and expression of miRNAs related to female flower induction in walnut (*Juglans regia* L.)[J]. Molecules, 23(5): 1-15.

(责任编辑 张丽春)