

过表达 miR398 对烟草抗旱性的影响

颜秦峰, 李科友, 石振楠, 王琳, 武永军

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以烟草为试材, 构建了拟南芥 *MIR398* 过表达载体, 对烟草进行了转基因试验, 研究了转基因烟草 T_1 代与野生型烟草在干旱条件下超氧阴离子、丙二醛、游离脯氨酸含量的差异。结果表明: 该试验成功将拟南芥 *MIR398* 基因转入烟草中, 与野生型相比, 转基因烟草在干旱胁迫下丙二醛与超氧阴离子含量都有所升高, 脯氨酸含量则相对降低。该试验结果说明了 miR398 在植物抗旱过程中的作用。

关键词: miR398; 转基因; 烟草; 抗旱性

中图分类号: S 572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)13-0111-06

干旱胁迫会导致植物体发育不良, 叶片变黄, 生长受到抑制, 严重时影响作物产量^[1-2]。干旱胁迫会激发

植物体内的许多生理生化反应和代谢变化使植物适应环境变化, 并帮助其度过逆境。近年来的研究发现, miRNA 作为一种重要的调控因子也能够参与到植物体响应外界胁迫的过程中^[3-5]。Sunkar 等^[6]在干旱、盐害、冷害、脱落酸胁迫下构建拟南芥幼苗的小 RNA 文库, 较早克隆出了 miR398 等 26 个与逆境胁迫应答相关的 miRNAs。Jones-Rhoades 等^[7]采用了比较基因组学的方法成功预测出了拟南芥和水稻基因组中十分保守的 miR398 家族, 其家族包括 3 个成员: miR398a、miR398b 和 miR398c。其中 miR398b 与 miR398c 的成熟序列完全

第一作者简介: 颜秦峰(1989-), 男, 硕士, 现主要从事植物抗逆分子生物学等研究工作。E-mail: namelessfit@hotmail.com

责任作者: 武永军(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物抗逆分子生物学等研究工作。E-mail: wuyongjun@nwsuaf.edu.cn

基金项目: 高校基本科研业务费专项资助项目; 国家自然科学基金资助项目(30600384); 西北农林科技大学大学生创新性实验计划资助项目。

收稿日期: 2013-03-19

Analysis of the Correlation Between Baicalin and Peroxidase Activity in the Callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi

JIAO Zhan-zhan, ZHANG Dong-xiang, ZHAO Jing, JIA Bin, MENG Qing-wei, ZHANG Chao

(College of Life Science and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Taking the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi as material, the relationship between the variation of peroxidase activity and baicalin secondary synthesis in the growth process of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi were studied. The results showed that during the growth cycle (27 days) of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi, the activity of the level of peroxidase and the accumulation of baicalin was positively correlated. During the former 15 days of the growth cycle of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi, the skullcap callus was in its growth phase. The activity of the peroxidase express at a low level. The synthesis of baicalin was slow. During 15 to 21 days, the callus was in its stable phase. The activity of peroxidase express at high levels and reached its maximum, at the same time baicalin rapidly synthesised and reached its maximum. During 21 to 27 days, the callus was in its aging period, while the activity of peroxidase reduced. The synthesis of baicalin almost stopped. $L_9(3^4)$ orthogonal table was used to optimize the ratio of medium 6-BA, carbon sources, nitrogen sources, the pH. The optimal culture conditions were 6-BA 2 mg/L, carbon source: 20 g sucrose+10 g glucose, nitrogen source (NH_4^+) 30 mmol/L, pH 6.0.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; callus; baicalin; peroxidase activity; orthogonal design

相同,而 miR398a 仅仅在 3' 端的最后一个核苷酸与 miR398b、miR398c 不同^[7-9]。miR398 在拟南芥和水稻中十分保守,暗示该 miRNA 可能在多种生物及非生物的胁迫应答响应中有作用。Jones-Rhoades 等^[7]通过对 miR398 的靶基因进行预测以及 5' RACE 技术进行验证,表明 miR398 可能靶向细胞质 CSD1 和叶绿体 CSD2 以及细胞色素 C 的氧化酶亚基 V(COX5b.1)。其中 CSD1 以及 CSD2 都参与了植物氧化胁迫的响应。这其中可能暗示了 miR398 在植物抗旱体系中可能发挥一定作用^[10]。

该试验通过构建 miR398 过表达的转基因烟草,在分子水平上对其抗旱性进行研究,旨在揭露 miR398 对烟草中抗旱性能的影响,以期为提高烟草抗旱性提供参考,并为改良作物的抗旱性能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试哥伦比亚野生型拟南芥、林氏烟草为西北农林科技大学生命科学学院实验室保存。

菌种和质粒: *E. coli* DH 5 α 感受态细胞、根癌农杆菌 GV3101 为该实验室保存; pBI121 质粒购于北京天恩泽公司。

酶和化学试剂: *Taq* DNA 聚合酶、特异性内切酶 *Xba* I、*Sac* I、*T₄* 连接酶、0.01% BSA, 购于 TAKARA 公司; Plasmid Mini Kit (OMEGA 公司); 引物由华大基因合成; 琼脂糖、琼脂粉, 氨苄青霉素, 卡那霉素, 6-BA, NAA。

1.2 试验方法

1.2.1 过表达载体构建 将配好的 MS 培养基与接种器皿灭菌(121 $^{\circ}$ C, 20 min), 拟南芥种子表面用 20% 漂白水杀菌 10 min 后用无菌水冲洗 3 次; 用枪头将种子液打到培养基上, 斜置将无菌水吸除, 用封口膜封好。冰箱 4 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后光培养 1 周, 待根长 3 cm 左右时, 利用镊子夹取拟南芥植株, 注意保护根部, 并冲洗掉培养基, 小心栽入培养基质(营养土: 蛭石=1:2(体积比))中。拟南芥培养 10 d 后, 用 CTAB 法提取拟南芥基因组 DNA, 利用 Primer premier 5.0 设计拟南芥 miR398 的引物, PCR 扩增拟南芥 miR398 前体全长片段, 对 PCR 扩增产物进行回收(Tiangen, 北京)。对 pBI121 载体与 PCR 扩增出的 miR398 用 *Xba* I 和 *Sac* I 进行双酶切将 pBI121 载体中的 *GUS* 基因用 miR398 的双酶切后基因代替, 将 miR398 用 *T₄* DNA 连接酶连接到 pBI121 载体上。连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选、培养、提质粒并酶切鉴定和测序验证。

1.2.2 转基因烟草的获得 取阳性 DH5 α 菌株扩大培养后提取质粒, 用电转化法转化到感受态农杆菌中, 选

取阳性克隆转染到烟草叶片中进行组织培养, 对原代(T_0)与子一代(T_1)拟南芥幼苗用特异性引物进行 PCR 检测拟南芥转基因阳性幼苗。

1.2.3 转基因烟草抗旱性检测 挑取生长状况良好且大小相近的转基因烟草植株和对照植物移栽到营养土中, 每组挑取 10 株。温度设置为 22~27 $^{\circ}$ C, 光照 14 h。每隔 1 d 浇等量的水, 植株进入旺盛生长期后开始控水试验。

1.3 项目测定

控水 10 d 后, 取植物叶片, 采用盐酸羟胺法^[11]测定超氧阴离子含量; 游离脯氨酸含量采用酸性茚三酮法测定^[12]; 丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法测定^[13]。

2 结果与分析

2.1 miR398 的克隆

根据拟南芥基因组和 miRBase 数据库数据可知, MIR398a 位于拟南芥 2 号染色体, 前体片段长度为 105 bp, MIR398b 位于拟南芥 5 号染色体, 前体片段为 116 bp。在 2 个基因位点两端设计引物, 包含 MIR398a 和 MIR398b 前体的片段分别为 229 bp 和 500 bp。从基因组中克隆的序列通过电泳分析结果见图 1。由图 1 可知, 该序列与数据库序列有 100% 的同源性正向引物带有 *Xba* I 酶切位点, 反向引物带有 *Sac* I 酶切位点, 双酶切后经 DNA cleanup Kit 回收待用。

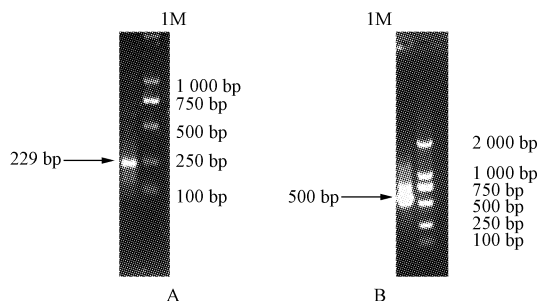


图 1 ath-miR398 基因前体片段的克隆

注: A: ath-miR398a 前体片段(1: miR398a M; D 2 000 marker); B: ath-miR398b 前体片段(1: miR398a M; D 2 000 marker)。

Fig. 1 Ath-miR398 precursor fragment

Note: A: ath-miR398a precursor fragment (1: miR398a M; D 2 000 marker); B: ath-miR398b precursor fragment (1: miR398a M; D 2 000 marker)。

2.2 过表达载体的构建

由图 2 可知, pBI-121 表达载体含 35S 驱动的 *GUS* 基因, NOS 驱动的卡那基因。pBI-121 利用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切后去掉 *GUS* 基因, 结果如图 3 所示, 环形质粒已被切成 *GUS* 基因和除去 *GUS* 基因剩下的部分。将上述双酶切回收的目的片段连接入表达载体 pBI-121 的双

酶切片段中。目的基因上游为 35S 启动子,两侧含有 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点。经转化 DH5 α ,挑阳性克隆,提质粒酶切后,送质粒测序,以 pBI-121 载体上的 35S 测序引物测序。由图 4 可知,该试验得到了正确插入目的基因的重组表达载体。以 miR398b 为例,将阳性重组载体用于转化农杆菌 GV3101,进一步转化烟草。

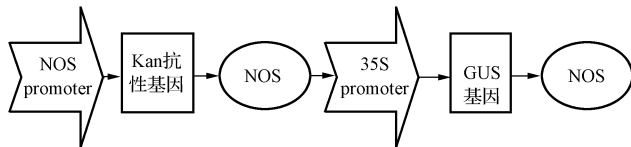


图 2 表达载体 pBI-121 的 T-DNA 区的结构

Fig. 2 The T-DNA region of vector pBI-121

>[gi|332002898|gb|CP002688.1|
Length=26975502

D Arabidopsis thaliana chromosome 5, complete sequence

Features in this part of subject sequence:
Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase...

Score = 902 bits(1000),Expect = 0.0
Identities = 500/500(100%),Gaps = 0/500(0%)
Strand = Plus/Plus

Query	49	TATCCCAAACATAATGAATGCCACATAAAGTCTGCTGCTACTACACAATTGTTGTGGTGT	108
Sbjct	4690846	TATCCCAAACATAATGAATGCCACATAAAGTCTGCTGCTACTACACAATTGTTGTGGTGT	4690905
Query	109	TATTTGTGTACTACCAATCCATTTCATTTGCTGTGTATTTATAGTTTCCAGCATGTTTGAG	168
Sbjct	4690906	TATTTGTGTACTACCAATCCATTTCATTTGCTGTGTATTTATAGTTTCCAGCATGTTTGAG	4690965
Query	169	ACAAACCAAACTCAAATGTAATAACAAGAAGATATCAATATATCATGAAGGTAGTGGA	228
Sbjct	4690966	ACAAACCAAACTCAAATGTAATAACAAGAAGATATCAATATATCATGAAGGTAGTGGA	4691025
Query	229	TCTCGACAGGGTTGATATGAGAACACACGAGTAATCAACGGCTGTAATGACGCTACGTCA	288
Sbjct	4691026	TCTCGACAGGGTTGATATGAGAACACACGAGTAATCAACGGCTGTAATGACGCTACGTCA	4691085
Query	289	TTGTTACAGCTCTCGTTTTTCATGTGTTCTCAGGTCACCCCTGCTGAGCTCTTTCTCTACC	348
Sbjct	4691086	TTGTTACAGCTCTCGTTTTTCATGTGTTCTCAGGTCACCCCTGCTGAGCTCTTTCTCTACC	4691145
Query	349	GTCCATCTTTTATCAAGGCTGGCTTTTACTCATTACCAAAATGGTGAAGTTCTATGTA	408
Sbjct	4691146	GTCCATCTTTTATCAAGGCTGGCTTTTACTCATTACCAAAATGGTGAAGTTCTATGTA	4691205
Query	409	AATTCGTATCGTAAAGTATTACAGATGAAATCACAGAAGTACAATTGTACAAACATAGTA	468
Sbjct	4691206	AATTCGTATCGTAAAGTATTACAGATGAAATCACAGAAGTACAATTGTACAAACATAGTA	4691265

图 4 包含 miR398b 前体片段测序结果 Blast 结果

Fig. 4 The sequence result of miR398b

2.3 转基因烟草的获得

按照电转化的方法,经表达载体转化后的农杆菌经 PCR 鉴定,从图 5 可以看出,转化后的农杆菌质粒经过了 PCR 检验,证明目的片段已经连接到载体中。按叶盘法利用含重组质粒的农杆菌转化 30 d 左右的烟草叶盘,经暗培养后,在选择培养基(500 mg/L Car 和 100 mg/L Kan 的 MS 培养基)上培养得到抗性愈伤组织。以 miR398b 为例,从图 6 和图 7 可以看出,经含 pBI-miR398b 重组质粒农杆菌侵染叶盘的愈伤组织能在具有抗生素培养基上正常生长。

待抗性芽长到 1.0~1.5 cm 时,将其切下换到含有 200 μ g/mL Car 和 100 mg/L Kan 的生根培养基上诱导生根,2~3 周后可获得抗性植株。待根系长到 1.0 cm 左右时,将幼苗移栽至土里,移栽的第 1 天用塑料薄膜

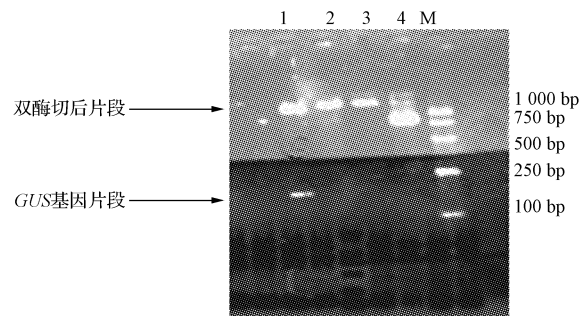


图 3 pBI121 质粒双酶切结果

注:1:pBI-121 双酶切;2:*Xba* I 单酶切;3:*Sac* I 单酶切;4:pBI-121 质粒;M:D 2 000 marker。

Fig. 3 Double restriction enzymes Digest of pBI-121

Note:1;pBI-121 double enzymes digestion;2;*Xba* I digestion;3;*Sac* I digestion;4. pBI-121 plasmid;M:D 2 000 marker.

Sort alignments for this subject sequence by:
E value Score Percent identity
Query start position Subject start position

图 5 转化农杆菌菌落 PCR 产物电泳结果

注:1,4:miR398a;2,5:miR398b;3,6:IPSI-miR398 mimicry;M:marker。

Fig. 5 Electrophoresis result of transformed

Agrobacterium tumefaciens colony PCR

Note:1,4; miR398a; 2, 5; miR398b; 3, 6; IPSI - miR398 mimicry; M; marker.



图6 经农杆菌转化后在选择培养基上得到的抗性愈伤组织

Fig. 6 Antibiotic-resistance *Agrobacterium tumefaciens*' infected callus

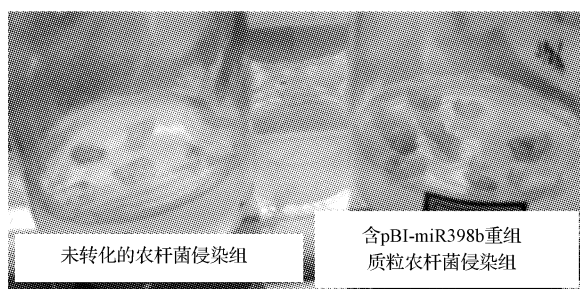


图7 农杆菌感染叶片的筛选

注:左:经未转化农杆菌感染的叶片筛选;右:经含 pBI-miR398b 重组质粒农杆菌感染叶片的筛选。

Fig. 7 Antibiotic selected *Agrobacterium tumefaciens*' infected leaves

Note: Left: None transformed *Agrobacterium tumefaciens*' infected leaves; Right: Recombined plasmid transformed *Agrobacterium tumefaciens*' infected leaves.

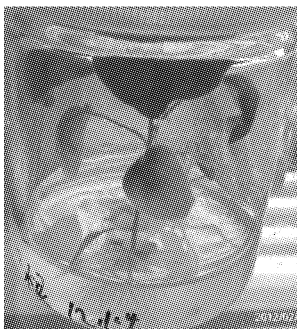


图8 转基因烟草的生根培养

Fig. 8 Transgenic *Nicotiana tabacum* rooting

将幼苗罩起来,使之逐步适应周围的环境。如图8和图9所示,转基因烟草可以正常生长。

2.4 转基因烟草的生化检测

提取抗性植株的基因组 DNA 并以其为模板进行 PCR 鉴定。由图10可以看出,该试验成功获得了 miR398b 的转基因阳性植株。所扩增的片段长度大约为 500 bp。只有那些确定不疑的条带所代表的株系作为才作为阳性转基因植株。试验共获得 1~6 号泳道的 6 个阳性转基因植株并将这些植株继续培育,以作后

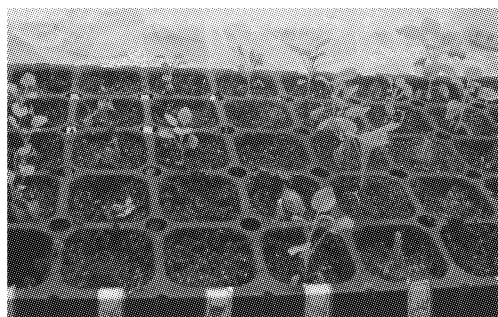


图9 将抗性幼苗移栽至营养土中

Fig. 9 Antibiotic selected seedlings transplanting

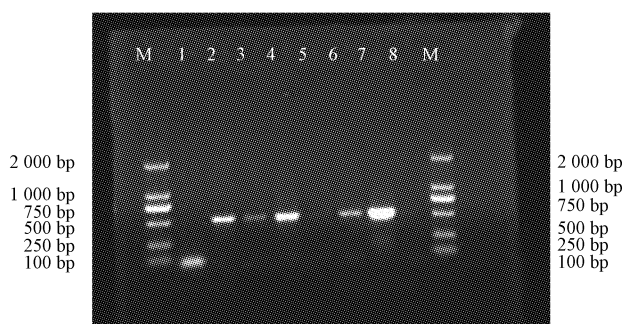


图10 抗性植株的 PCR 鉴定

注:M; D 2 000 marker; 1~6: 为抗性植株; 7: pBI-miR398b 重组质粒对照; 8: 非转基因对照。

Fig. 10 The PCR identify of transgenic tobacco

Note: M; D 2 000 marker; 1~6: Resisted plant; 7: pBI-miR398b recombined plasmid transformed *Agrobacterium tumefaciens*' infected plant; 8: Wild-type plant.

续筛选之用。

2.5 转基因烟草的抗旱性检测

3 个月后得到 T₁ 代转基因烟草种子,首先在 100 mg/L Kan 抗性培养基上进行抗性筛选,发芽率为 90%,如图11所示。生根 2 周后,移栽到营养土后,在组培室内培养。1 个月后进行干旱胁迫处理。控水 10 d 后转 miR398 T₁ 代无论在叶片大小还是株高上都明显不如野生型发育的好。

由图13可知,超氧阴离子在转基因烟草叶片中的

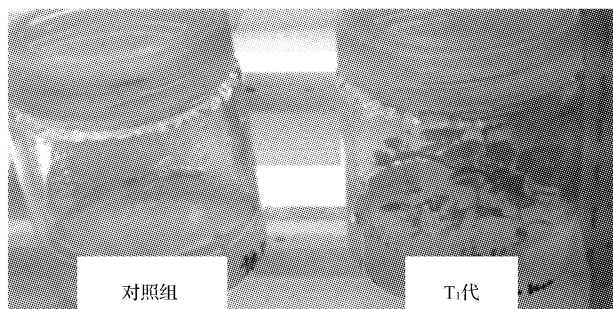
图11 T₁代种子与对照种子在抗性培养基上的发芽生长情况

Fig. 11 Germination of seeds on antibiotic medium

积累比在野生型烟草叶片中积累的多 10.6%,说明转基因烟草对超氧阴离子的清除能力低于野生型。丙二醛作为反映植物膜脂氧化程度的指标之一,反映了植物在逆境下膜脂受到的伤害程度。转基因烟草叶片中丙二

醛含量比野生型烟草叶片中丙二醛含量高 24.3%,反映出了转基因植株膜脂受到的伤害比野生型大。游离脯氨酸作为植物体内的调节物质,在转基因烟草叶片中脯氨酸含量比转基因烟草叶片中低 4.9%。

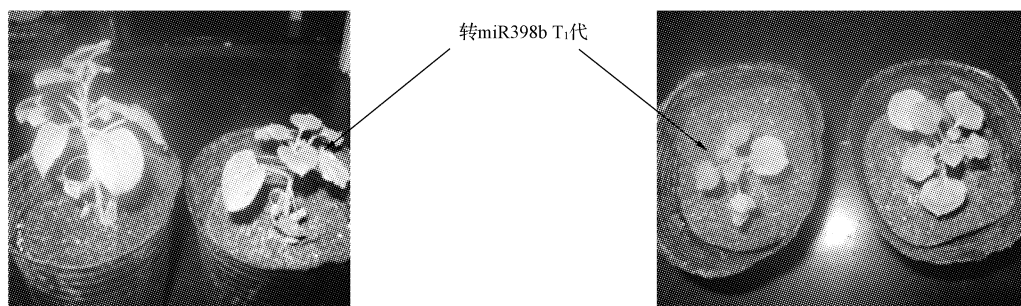


图 12 对转基因 T₁ 代植株和野生型控水试验

Fig. 12 The growth condition after drought processing of transgenic T₁

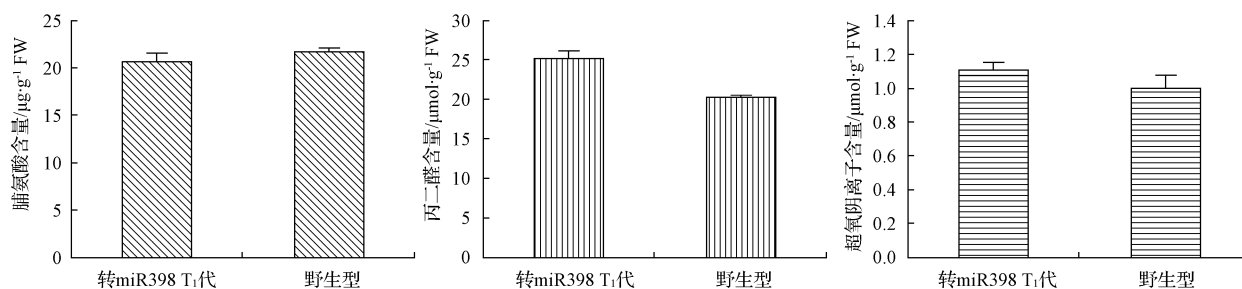


图 13 脯氨酸、丙二醛、超氧阴离子测定结果

Fig. 13 Result of Pro, MDA, superoxide anion radical content

3 讨论

自从 2004 年 miRNA398 首次被 Zhu 等^[14]克隆后,对该家族 miRNA 的研究就从未间断。MiRNA 的靶基因 CSD1 和 CSD2 都已被证实在植物体清除活性氧(Reactive oxygen species, ROS)系统中发挥着重要作用^[10,15]。ROS 是植物体内光合作用以及呼吸作用产生的副产物,通常情况下保持在一个稳定范围。但是当植物体内渗透压变化、或者遭受营养缺乏等胁迫时,光合以及呼吸作用的电子传递链会产生过量的 ROS,甚至诱导 NADPH 氧化酶等产生 ROS。ROS 本身是一种细胞毒素,高浓度的 ROS 会对细胞本身造成伤害。而 miR398 在植物体内表达量的变化会直接影响到植物体自身对氧化胁迫的耐受程度^[10,16]。

该试验中由于在烟草中转入 miR398,转基因植株中的 CSD 基因下调,导致了转基因株氧化胁迫的耐受能力降低。过表达 miR398b 的 T₁ 代植株中,氧自由基含量较对照组高出 10% 左右。

研究表明,植物体内基因间的调控是多种多样的,仅仅对于 miRNA 这一种调控因子来说,其本身就是一种网络状调控方式。一种 miRNA 可以调控多种

mRNA,而多个不同家族的 miRNA 也会共同调控一种 mRNA 的表达。例如该试验选取的 miR398,不仅在植物受到臭氧、干旱、盐害以及重金属胁迫下表达发生变化,而且在受到一些非生物胁迫时,其表达量也会相应的变化。Jagadeeswaran 等^[17]用丁香假单胞杆菌番茄致病变种的无毒性 Pst DC3000(avrRpm1)或 Pst DC3000(avrRpt2)菌株侵染拟南芥叶时,也检测出来了 miR398 的表达受到了抑制,表明 miR398 可以调控适应多种生物或非生物胁迫时产生的 mRNA。另外 miR398 与 CSD 之间的调控机制是十分复杂的。如 CSD2 与 miR398 之间不总是呈现出显著的负相关性。如 Moeder^[18]等发现顺乌头酸酶结合 CSD2 mRNA 的 5'UTR,使得拟南芥和烟草中 CSD2 mRNA 的稳定性增强,使得 miR398 对 CSD2 的调控效率显著下降。

植物在逆境下遭受伤害与活性氧积累诱发的膜脂过氧化作用密切相关,丙二醛就是膜脂过氧化产物之一。试验显示,转 miR398b T₁ 代植株,丙二醛含量升高 24% 左右,与超氧阴离子自由基(O₂⁻)变化趋势相同。在干旱条件下,植物体内脯氨酸含量显著增加,植物体内的脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗旱

性好的品种积累的脯氨酸多。该试验中 T_1 代植株相对野生型其脯氨酸积累降低了 5% 左右。

对于 T_1 代形态学观察以及生理指标的检测可以看出, miR398 对烟草抗旱能力方面有一定影响, 具体影响还需在转基因 T_2 代植株中进一步研究。

目前有关 miRNA 的研究主要集中于 miRNA 的下游靶基因, 对于 miRNA 自身调控的研究并不多见^[19-20]。对 miRNA 具体功能的研究, 除了需要研究其下游靶基因外, 更需要与其上游调控因子相结合, 才能更全面的反映基因在细胞中全方位, 多层次的调控网络机制。

参考文献

- [1] 杨洪兵, 邱念伟, 陈敏, 等. 小麦耐盐机理及培育抗盐品种研究进展[J]. 山东师大学报, 2001, 16(1): 79-82.
- [2] 王忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs, Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Schwab R, Palatnik J F, Riester M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. Dev. Cell, 2005, 8(4): 517-527.
- [5] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science, 2003, 301(5631): 336-338.
- [6] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2004(16): 2001-2019.
- [7] 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.
- [8] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance[J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 2051-2065.
- [9] Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, et al. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa identifies important target genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(31): 11511-11516.
- [10] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [11] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 65-67.
- [12] 喻方圆, 徐锡增. 植物逆境生理研究进展[J]. 世界林业研究, 2003, 16(5): 58-68.
- [13] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及膜脂过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605-615.
- [14] Zhu C, Ding Y F, Liu H L. MiR398 and plant stress responses[J]. Physiologia Plantarum, 2011, 143: 1-9.
- [15] Dugas D V, Bartel B. Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67(4): 403-41.
- [16] Kliebenstein D J, Monde R A, Last R L. Superoxide dismutase in Arabidopsis: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization[J]. Plant Physiology, 1998, 118(2): 637-650.
- [17] Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis [J]. Planta, 2009, 229(4): 1009-1014.
- [18] Moeder W, Del Pozo O, Navarre D A, et al. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(2): 273-287.
- [19] 李培旺, 卢向阳, 李昌珠, 等. 植物 microRNAs 研究进展[J]. 遗传, 2007, 29(3): 283-288.
- [20] 丁艳菲, 王光钺, 傅亚萍, 等. miR398 在植物逆境胁迫应答中的作用[J]. 遗传, 2010, 32(2): 129-134.

Effect of Over-expressed miR398 on the Drought Resistance of *Nicotiana tabacum*

YAN Qin-feng, LI Ke-you, SHI Zhen-nan, WANG Lin, WU Yong-jun

(College of Life Sciences, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking *Nicotiana tabacum* as material, an over-expressing *MIR398* plasmid vector was constructed and introduced into the *Nicotiana tabacum* successfully. Some physiological indicators such as superoxide anion radical, malondialdehyde (MDA) and proline (Pro) content was studied and compared between wild-type *tabacum* and transgenic plant T_1 generation. The results showed that MDA and superoxide anion radical content accumulated more than wild-type plant, while Pro content was declined under the drought stress in the transgenic plant. This result further proved the role of miR398 in plant drought resistance.

Key words: MiR398; transgenic; *Nicotiana tabacum*; drought resistance