网络出版时间:2018-03-09 17:09 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.07.015
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180309.1708.030.html

苹果 *HYL*1 基因在干旱中的表达与功能分析

王丽平[1,2],姜丽娟[1,2],马锋旺[1,2],管清美[1,2]
(1 西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100;2 旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】分析干旱处理下苹果 *HYL*1 基因(*MdHYL*1)在苹果中的表达情况,并初步分析过量表达 *MdHYL*1 转基因苹果根系的生长情况,以了解 *MdHYL*1 在干旱中的功能特性。【方法】从金冠苹果中克隆出 *MdHYL*1 基因,对其进行干旱下的表达分析、系统进化分析和组织特异性表达分析;利用 Gateway 技术构建植物过表达载体 pGWB414-MdHYL1,通过根癌农杆菌介导法转化苹果无性系 GL-3,经卡那霉素筛选,采用 PCR 和 RT-qPCR 技术鉴定阳性转基因株系,并对转基因株系的根系生长情况进行观测。【结果】*MdHYL*1 包含长 1 479 bp 的完整开放阅读框,编码 492 个氨基酸,位于 chr15 染色体上;系统进化树分析表明,苹果 MdHYL1 与梅 PmHYL1、桃 PpHYL1 蛋白的关系最近;组织特异性表达分析表明,*MdHYL*1 基因在楸子各组织器官中的表达量为叶>茎>花>根>果实;干旱处理下 *MdHYL*1 基因的表达量显著上调,而转基因植株鉴定结果表明,*MdHYL*1 基因已成功转入苹果植株中,3 个过表达 *MdHYL*1 转基因株系的根系较未转基因株系(对照)明显增多。【结论】*MdHYL*1 基因能够响应干旱胁迫,且转基因苹果根系更发达,表明其可能在苹果耐旱过程中起重要作用。

[关键词] 苹果;*MdHYL*1;转基因;耐旱性
[中图分类号] S661.103.4;Q78 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2018)07-0109-08

Expression and fuction analysis of *MdHYL* 1 gene in apple under drought tolerance

WANG Liping[1,2],JIANG Lijuan[1,2],MA Fengwang[1,2],GUAN Qingmei[1,2]
(1 *College of Horticulture,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*;
2 *State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*)

Abstract:【Objective】 The expression level of *MdHYL*1 and the root growth of *MdHYL*1 overexpressing transgenic apple under drought treatment were analyzed to understand the function of *MdHYL*1 gene in drought tolerance of apple. 【Method】 *MdHYL*1 gene was cloned from 'Golden Delicious' apple and its expression level under drought, phylogenetic relationship and tissue specific expression were analyzed. The plant overexpression vector pGWB414-MdHYL1 was constructed using the Gateway system. Agrobacterium-mediated transformation was performed using clonal apple GL-3 as the plant vector and positive transgenic lines were selected by kanamycin before being identified by PCR and RT-qPCR. The root growth of transgenic lines was then obeserved. 【Result】 The *MdHYL*1 gene contained an ORF of 1 479 bp encoding 492 amino acids and was located on chr15. Phylogenetic tree analysis showed that MdHYL1 protein was closely related to PmHYL1 and PpHYL1 proteins. Tissue specific expression showed that the expression level of *MdHYL*1 gene was in the order of leaf >stem >flower >root >fruit. *MdHYL*1 gene was signifi-

[收稿日期] 2017-04-21
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31572106,31622049)
[作者简介] 王丽平(1992—),女,湖南岳阳人,硕士,主要从事果树育种与生物技术研究。E-mail:lipingwang@nwsuaf.edu.cn
[通信作者] 管清美(1979—),女,山东潍坊人,教授,博士生导师,主要从事果树育种与生物技术研究。
E-mail:qguan@nwsuaf.edu.cn

cantly up-regulated under drought treatment and three *MdHYL*1 transgenic lines were identified with remarkably dense roots compared with the untransgenic control.【Conclusion】*MdHYL*1 gene could respond to drought stress and transgenic apple lines had increased root number, indicating that *MdHYL*1 gene may play an important role in drought tolerance of apple.

Key words: apple; *MdHYL*1; transgenic; drought tolerance

苹果(*Malus domestica*)是我国温带地区最主要的栽培果树之一,其优势产区多分布于干旱半干旱的温带地区。因此,干旱成为制约苹果生产的主要因素。随着分子生物学、组织培养和转基因等生物技术的成熟与迅速发展,研究者克隆了大量的苹果抗旱相关基因,并对其进行了模式植物拟南芥、烟草等的异位表达及对苹果自身的遗传转化研究。

目前,通过基因工程和转基因等生物技术手段已经获得了一些抗旱性增强的转基因植株。如苹果CBL互作蛋白激酶*MdCIPK6L*基因,在转基因拟南芥中能够响应包括干旱在内的多种非生物逆境胁迫[1];苹果珠眉海棠*MzASMT*1基因转入拟南芥后,在干旱处理下表达量显著上调,其过量表达使拟南芥中褪黑素含量上调2~4倍,过表达拟南芥中内源活性氧(ROS)含量则显著减少,从而使其具有更强的耐旱性[2];同样,将苹果抗旱基因在烟草中异位表达也可以提高转基因烟草的抗旱性[3-4]。近年来,也获得了一些苹果抗旱转基因植株,如将苹果MYB转录因子基因*MdSIMYB*1转化苹果后,过量表达的转基因苹果株系在各种非生物逆境条件下的抗性均出现显著增强[3];从新疆野苹果中分离出DREBs转录家族中的一个基因*MsDREB*6.2,发现该基因在苹果中过量表达可影响气孔的开张密度和根系生长,从而能够增强苹果的耐旱性[5]。

*HYL*1(HYPONASTIC LEAVES 1)基因自首次被发现以来[6],对其功能研究就主要集中在miRNA的合成方面,对其在抗逆尤其是抗旱机制中的功能研究尚未见报道。目前,*HYL*1的相关研究主要集中在模式植物拟南芥中且已经非常成熟,但在苹果中的研究则刚起步,现有研究发现其在苹果中主要参与了miRNA的合成、苹果树形结构的形成[7]、对IAA表达的响应[8]及非生物逆境胁迫[9]等过程。本研究通过克隆*MdHYL*1基因并将其转化入苹果,分析*MdHYL*1在苹果抗旱过程中的功能,并通过转基因手段获得抗旱苹果种质,以期为*HYL*1基因在抗逆分子机制中的研究及为苹果抗旱遗传改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 用于基因克隆和表达分析的试验材料为金冠(*M. domestica*)和楸子(*M. prunifolia*),用于转基因的苹果来自沈阳农业大学张志宏教授实验室的无性系GL-3[10]。

1.1.2 菌株、质粒与试剂 大肠杆菌(*E. coli*)感受态TOP10、pGWB414过表达载体、pDONR 222载体和用于遗传转化的农杆菌EHA105菌株等,均保存于西北农林科技大学园艺学院果树逆境生物学团队实验室;用于构建Gateway载体的BP酶和LR酶,购于上海Invitrogen公司;DNA聚合酶购于北京全式金生物技术有限公司;反转录试剂盒购于Thermo Fisher Scientific公司,质粒小提试剂盒和DNA纯化回收试剂盒购于天根生化科技有限公司;Premix RTaq、DNA Marker等购于大连宝生物工程有限公司;IAA、6-BA、IBA等植物激素购于Sigma-AIdrich中国公司;引物合成和测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 苹果*MdHYL*1基因的克隆

从拟南芥信息资源网站(Tair, http://www.arabidopsis.org/)中查找并下载AtHYL1蛋白的氨基酸序列,登录号为AT1G09700。将这条序列放到美国国立生物技术信息中心(NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中与苹果基因组进行blastp搜索,筛选出一致性最高的苹果基因序列,并据此设计*MdHYL*1基因克隆的特异引物(F:5′-ATGTCCACAAACGAAGGCTTTC-3′;R:5′-TTAGCACATATGTTGCACCTGC-3′)。采用改良CTAB法提取金冠叶片总RNA[11],将反转录得到的cDNA用作克隆*MdHYL*1的模板。PCR扩增体系如下:cDNA 0.2 μL,正向和反向引物各1 μL,dNTP 2.5 μL,TRANS 10×Pfu Buffer with $MgSO_4$ 5 μL,TRANS Pfu DNA polymerase 0.5 μL,ddH_2O补至25 μL。反应程序为:95 ℃预变性2 min;95 ℃变性20 s,56 ℃退火20 s,72 ℃延伸2 min,35个循环;72 ℃延伸5 min。PCR扩增产物用1%的琼脂糖凝胶

电泳检测，用回收试剂盒回收纯化后连接到入门载体 pDONR222 上，再转化至大肠杆菌感受态 TOP10 中，挑取阳性克隆，PCR 检测后测序。

1.3　苹果 *MdHYL1* 基因的蛋白序列分析

运用 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）的 blastp 功能，对已鉴定出的 *MdHYL1* 基因的蛋白序列进行比对，参数均为默认参数。将用于进化分析的物种蛋白序列下载下来，用 DNAMAN 软件进行比对，输出比对结果。然后使用 MEGA 5.05，对苹果（*Malus domestica*）、桃（*Prunus persica*）、梅（*Prunus mume*）、水稻（*Oryza sativa*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、枣（*Ziziphus jujube*）、大豆（*Glycine max*）、油菜（*Brassica napus*）和模式植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）等 9 个物种的 HYL1 蛋白进行进化分析。以邻近法（Neighbor-joining，NJ）构建进化树，参数设置为：校验参数 Bootstrap method＝500，其余参数为默认参数。

1.4　苹果 *MdHYL1* 基因的表达分析

用于干旱胁迫下 *MdHYL1* 基因表达分析试验的材料为 3 个月大嫁接于平邑甜茶上的金冠苹果苗，生长条件为 25 ℃，光照时间 10 h/d。当土壤相对含水量为土壤最大含水量的 85%时开始进行短期干旱处理，处理 0，2，4，6，8 d 后复水，在各时间点分别采样，每 7 株 1 个重复，每个处理 3 个生物学重复。组织特异性表达试验使用楸子苹果苗，叶片 RNA 用改良 CTAB 法提取[11]，根、茎、花和果实 RNA 用天根生化科技有限公司的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取。

RNA 完整性采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测，用 RNA 反转录试剂盒进行反转录。RT-qPCR 使用美国 Bio-Rad 公司的 CFX96TM 荧光定量 PCR 仪进行，以 *MdMDH* 为内参基因（引物序列为：F. 5′-CGTGATTGGGTACTTGGAAC-3′；R. 5′-TGGCAAGTGACTGGGAATGA-3′）。

1.5　苹果 *MdHYL1* 基因植物表达载体的构建

本试验选用 pGWB414 载体作为 *MdHYL1* 过量表达载体。将去掉终止密码子的 *MdHYL1* 全长序列转化到中间载体 pDonor222 上，通过 Gateway 重组技术（Invitrogen）将该序列构建到带有 HA 标签和选择标记基因 *Npt* Ⅱ 的 pGWB414 载体上（结构如图 1 所示），然后将重组质粒用电击法转化农杆菌 EHA105。

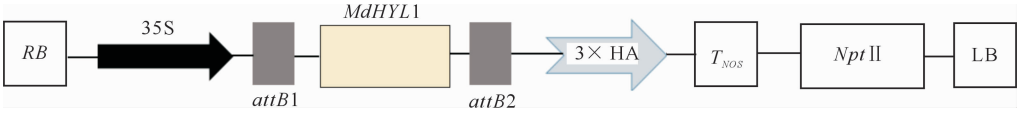


图 1　*MdHYL1* 基因植物表达载体 MdHYL1-pGWB414 的结构

Fig. 1　Structure of *MdHYL1* plant expression vector MdHYL1-pGWB414

1.6　苹果 *MdHYL1* 基因的转化与转基因株系的鉴定

采用农杆菌介导的遗传转化方法[12]，对苹果无性系 GL-3 进行 *MdHYL1* 基因的转化。将转基因苹果苗置于组培间，生长条件为温度 25 ℃，光照时间 10 h/d，光照强度 3 000～5 000 lx。

转基因株系的鉴定采用 PCR 和 RT-qPCR 2 种方法。从采用卡那霉素筛选的抗性植株叶片中分别提取 DNA 和 RNA，以提取的 DNA 为模板，使用特异性检测引物（F：5′-CAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTACG-3′；R：5′-AGAAGGCGCATGGGAAGG-3′）进行电泳检测，以未处理的 GL-3 植株 DNA 为阴性对照。以转基因株系 RNA 反转录的 cDNA 为模板，进行 RT-qPCR 检测，定量引物为：F. 5′-AGAAACCCACAGGAGACAAGGC-3′；R. 5′-CATCATTATCGCAGGGAATCAAA-3′。内参基因使用 *MdHYL1* 表达分析所用的 *MdMDH* 基因。RT-qPCR 反应体系为：GoTaq 10 μL，正向和反向引物各 1 μL，cDNA 5 μL，ddH_2O 补至 20 μL。RT-qPCR 程序为：95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，58 ℃ 15 s，72 ℃ 45 s，45 个循环；60～95 ℃，30 s，37 个循环，即从第 2 个循环开始由 60 ℃每次升高 0.5 ℃，并在该温度下保持 30 s，37 个循环后达到 95 ℃。每个株系均包含 3 个生物学重复，RT-qPCR 加样时使用 3 个技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[13]计算 *MdHYL1* 基因在不同株系中的相对表达量。

1.7　*MdHYL1* 过量表达转基因苹果根系的生长观测

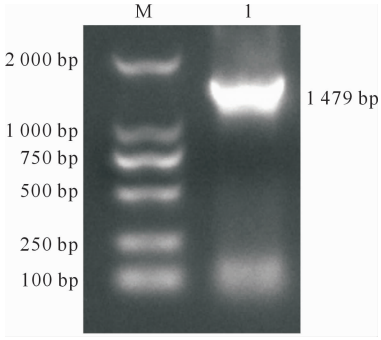
将 *MdHYL1* 过量表达转基因苹果株系和未转基因对照同时进行扩繁生根，生根 45 d 后观察转基因株系与未转基因株系（对照）的根系生长情况。同时，对根系数目进行统计，以 6 株为 1 个重复计算根系数目的平均值，每组 3 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 苹果 *MdHYL1* 基因的克隆与序列分析

2.1.1 苹果 *MdHYL1* 基因的克隆 将拟南芥 HYL1 蛋白序列与美国国立生物技术信息中心(NCBI,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中的苹果基因组序列进行 blastp 比对,筛选出一致性最高的苹果基因序列,登录号为 XP_008338962,根据其设计基因克隆的特异引物。以金冠苹果叶片 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增出一段 1 479 bp 的序列(图 2),全长开放阅读框为 1 479 bp,编码 492 个氨基酸,位于 chr15 染色体上,将其命名为 *MdHYL1*,与登录号为 XP_008338962 的基因序列完全一致。

2.1.2 苹果与其他物种 HYL1 蛋白序列的比对 将苹果与桃、梅、水稻、黄瓜、枣、大豆、油菜、拟南芥等共9个物种的 *HYL1* 基因的蛋白序列进行比对,结果(图 3)显示,9 个物种的 *HYL1* 基因蛋白序列的 N 端较保守,均含有 2 个非常保守的双链 RNA 结合结构域 DSRM。

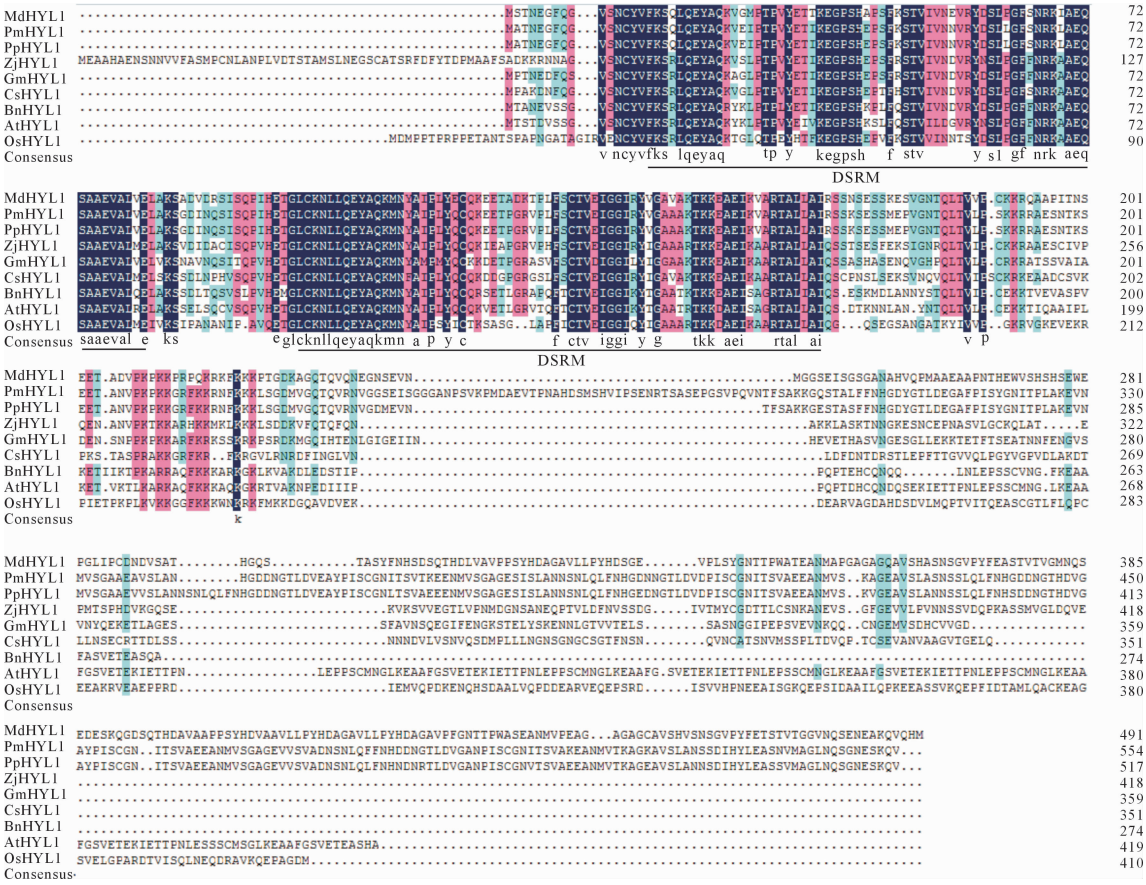


M. DL2000 DNA Marker;1. 目的片段

M. DL2000 DNA Marker;1. Target sequence

图 2 *MdHYL1* 基因的 PCR 克隆

Fig. 2 PCR cloning of *MdHYL1*



DSRM. 双链 RNA 结合结构域;MdHYL1. 苹果;PmHYL1. 梅;PpHYL1. 桃;ZjHYL1. 枣;GmHYL1. 大豆;CsHYL1. 黄瓜;BnHYL1. 欧洲油菜;AtHYL1. 拟南芥;OsHYL1. 水稻。图 4 同

DSRM. Double-stranded RNA Binding Motif;MdHYL1. *Malus domestica*;PmHYL1. *Prunus mume*;PpHYL1. *Prunus persica*;ZjHYL1. *Ziziphus jujube*;GmHYL1. *Glycine max*;CsHYL1. *Cucumis sativus*;BnHYL1. *Brassica napus*;AtHYL1. *Arabidopsis thaliana*;OsHYL1. *Oryza sativa*. The same for Fig. 4

图 3 苹果与其他物种 HYL1 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of HYL1 proteins from apple and other species

2.1.3　苹果 MdHYL1 蛋白的系统进化分析　为了研究苹果 HYL1 蛋白的系统进化过程，对苹果、桃、梅等 9 个物种的 HYL1 蛋白进行了系统进化分析，用于构建进化树的 HYL1 蛋白如表 1 所示。

表 1　用于构建进化树的其他 8 个物种的 HYL1-like 蛋白

Table 1　HYL1-like proteins used to construct phylogenetic tree from other eight species

物种 Species	蛋白名 Protein name	登录号 Accession number	物种 Species	蛋白名 Protein name	登录号 Accession number
梅 *Prunus mume*	PmHYL1	XP_008219245.1	黄瓜 *Cucumis sativus*	CsHYL1	XP_011649689.1
桃 *Prunus persica*	PpHYL1	XP_007222869.1	欧洲油菜 *Brassica napus*	BnHYL1	NP_001302780.1
大豆 *Glycine max*	GmHYL1	XP_003523789.1	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	AtHYL1	NP_563850.1
枣 *Ziziphus jujube*	ZjHYL1	XP_015866508.1	水稻 *Oryza sativa*	OsHYL1	AAY21792.1

由构建的进化树（图 4）发现，MdHYL1 蛋白在进化上与蔷薇科的梅和桃亲缘关系最近，与拟南芥、水稻、欧洲油菜亲缘关系较远。

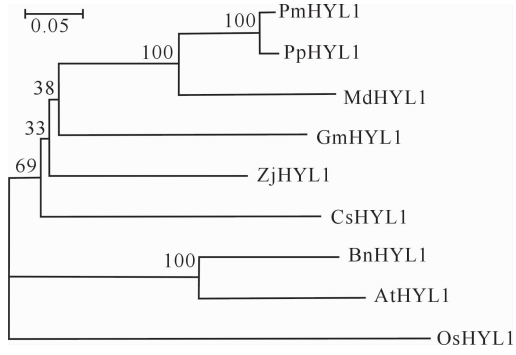


图 4　苹果和其他物种 HYL1 蛋白的系统进化分析

Fig. 4　Phylogenetic analysis of HYL1 homologous proteins from apple and other species

2.2　苹果 *MdHYL1* 基因的表达分析

2.2.1　苹果 *MdHYL1* 基因的组织特异性表达　为了研究 *MdHYL1* 基因在苹果不同组织和器官中的表达情况，分别提取了楸子根、茎、叶、花和果实的 RNA，利用 RT-qPCR 的方法分析了 *MdHYL1* 基因在各器官组织中的表达。如图 5 所示，*MdHYL1* 在楸子各器官和组织中均有表达，其中在茎、叶和花中表达量较高。与根中表达量相比，*MdHYL1* 在叶片中的表达量最高（3.85 倍），其次是茎（3.49 倍）和花（3.30 倍），在果实中的表达量最少（0.10 倍）。

2.2.2　苹果 *MdHYL1* 基因在干旱胁迫下的表达　对金冠苹果苗进行短期干旱处理，并利用 RT-qPCR 方法研究 *MdHYL1* 基因在干旱胁迫下叶片中的表达情况。如图 6 所示，干旱处理不同时间 *MdHYL1* 基因表达量均上调，且随着干旱处理时间的延长，*MdHYL1* 基因的表达量出现先升后降的趋势，在干旱处理 6 d 时表达量达到峰值，为处理 0 d 时的 8.82 倍；而在处理 8 d 后，*MdHYL1* 基因表达量则稍微下降，但较未进行干旱处理的金冠苹果仍呈现上调表达，达到 4.17 倍；复水后，*MdHYL1* 基因的表达量则又重新恢复。上述结果表明，*MdHYL1* 基因可以响应干旱胁迫。

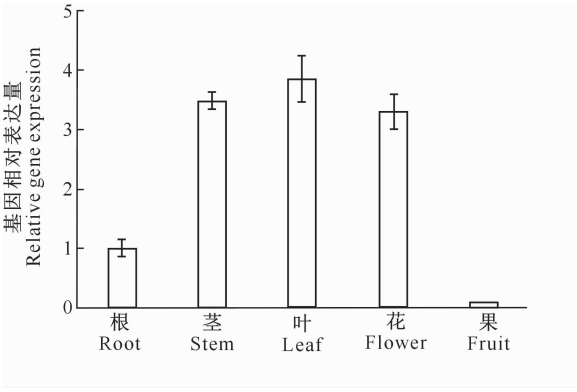


图 5　*MdHYL1* 在楸子中的组织特异性表达

Fig. 5　Tissue specific expression of *MdHYL1* in *Malus prunifolia*

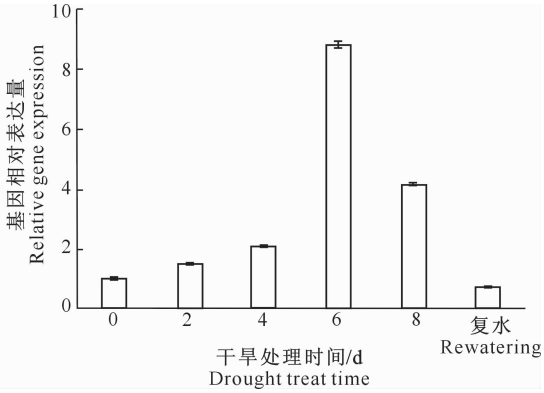


图 6　'金冠'苹果叶片中 *MdHYL1* 基因表达随干旱处理时间的变化

Fig. 6　Change of expression level of *MdHYL1* gene in leaves from 'Golden Delicious' apple over drought treat time

2.3　*MdHYL1* 过量表达转基因苹果株系的鉴定

2.3.1　转基因株系的 PCR 检测　使用苹果无性系 GL-3 为材料，通过农杆菌介导法对苹果 *MdHYL1* 过量表达载体进行转基因，共获得 3 个对 50 mg/L 卡那霉素具有抗性的阳性株系，分别为 OE＃5、OE＃10 和 OE＃13。以这 3 个阳性株系的 DNA 为

模板进行 PCR 检测,由于 35S 引物结合不特异,选取了 pGWB414 载体上 35S 上游的一段序列为正向引物,以 *MdHYL*1 全长开放阅读框上的一段序列作为反向引物进行 PCR 扩增。结果显示,3 个阳性株系中均克隆出含有该片段的条带,而未进行转基因的 GL-3 株系则没有出现该条带(图 7),表明这 3 个转基因株系中存在 *MdHYL*1 基因的插入,从 DNA 水平上可初步确认为转基因株系。

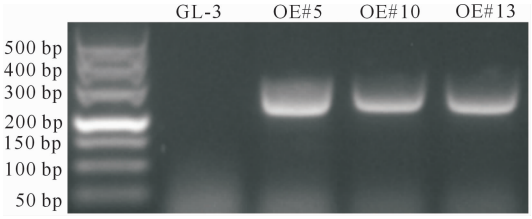


图 7 *MdHYL*1 过表达苹果株系的 PCR 检测

Fig. 7 PCR identification of *MdHYL*1 overexpression transgenic apple lines

2.3.2 转基因株系的 RT-qPCR 检测 从 3 个转基因阳性苹果株系的叶片中提取 RNA,并进行了 RT-qPCR 检测分析,结果见图 8。

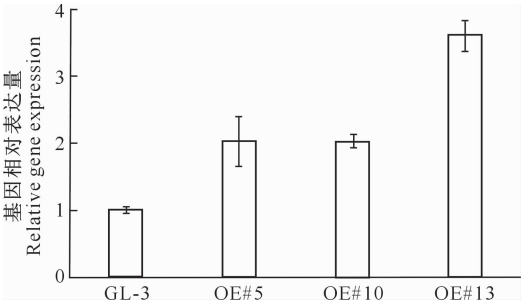


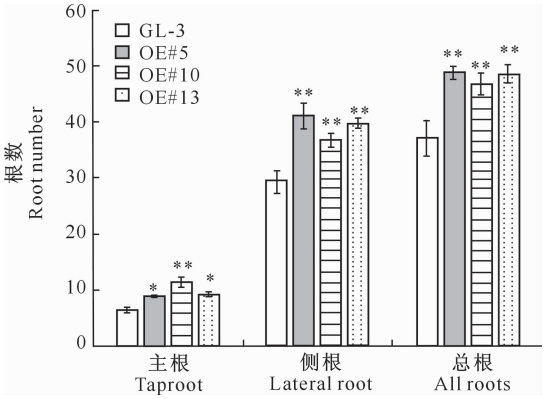
图 8 *MdHYL*1 在过表达转基因苹果株系中的 mRNA 相对表达量

Fig. 8 Relative mRNA expression of *MdHYL*1 in overexpression transgenic apple lines

图 8 表明,与阴性对照 GL-3 相比,3 个转基因阳性株系中 *MdHYL*1 的表达量均出现上调,OE#5、OE#10 和 OE#13 的相对表达量分别为 GL-3 的 2.03倍、2.02 倍和 3.61 倍,表明 3 个株系从转录水平上也可确定为 *MdHYL*1 过量表达株系。

2.4 *MdHYL*1 过量表达转基因苹果株系根系的生长情况

将鉴定出来的 3 个 *MdHYL*1 过量表达转基因株系进行了扩繁生根,对根系数量进行统计(图 9)后发现,3 个转基因株系单株不定根的主根数目显著高于未转基因的对照 GL-3,转基因株系单株不定根上的侧根以及整个不定根的数目极显著多于对照。



显著性分析选择双侧 t 分布检验:*. $P<0.05$;**. $P<0.01$

Statistical significance was determined by a two-sided t-test: *. $P<0.05$; **. $P<0.01$

图 9 *MdHYL*1 过量表达转基因苹果苗的根系数目

Fig. 9 Number of roots in *MdHYL*1 overexpression transgenic apple lines

对根系生长情况进行观察也发现,生根 45 d 后,转基因株系与对照相比根系发育明显发达,根系生长健壮且根系数目明显较多(图 10)。

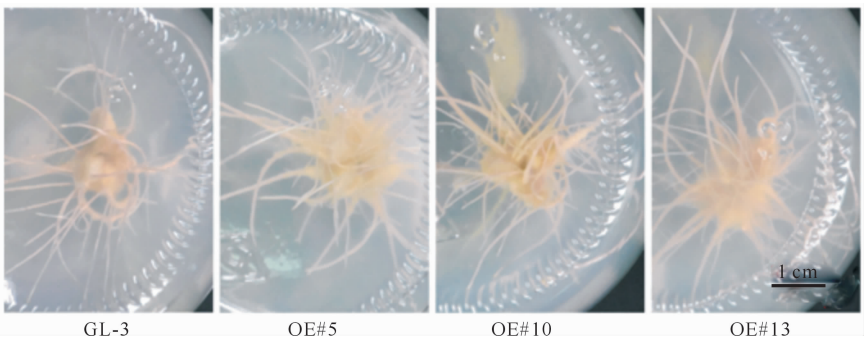


图 10 *MdHYL*1 过量表达转基因苹果苗的根系生长情况

Fig. 10 Root growth of *MdHYL*1 overexpression transgenic apple lines

*MdHYL*1 基因在干旱下的表达量显著上调，且过量表达 *MdHYL*1 后转基因株系根系明显发达，而根系越发达则苹果抗旱能力越强，这些结果表明 *MdHYL*1 基因可能在苹果响应干旱的过程中发挥了重要作用。

3　结论与讨论

本研究以金冠苹果叶片 cDNA 为模板，通过 PCR 克隆得到 *MdHYL*1 基因，这也是该基因首次从金冠苹果中被克隆到。对 MdHYL1 蛋白进行系统进化分析，揭示出其在进化上的来源与蔷薇科的植物最为相近，与模式植物拟南芥和水稻则非常远。组织特异表达分析结果表明，该基因在苹果各个器官和组织中均有表达，表达量为叶＞茎＞花＞根＞果实。

通过构建 *MdHYL*1 基因的植物过量表达载体，成功转化苹果 GL-3 并获得 3 个转基因株系。测定 *MdHYL*1 基因在干旱胁迫下的表达情况发现，*MdHYL*1 基因在干旱处理后表达量最大为未处理苹果株系的 8.82 倍，表明 *MdHYL*1 基因在干旱条件下被诱导表达，说明其在植物抗旱中具有重要作用。而在本实验室前期的研究中，通过对干旱处理下转基因苹果株系净光合速率、气孔导度、蒸腾速率和瞬时水分利用效率等生理参数的测定及存活率的统计，发现 *MdHYL*1 转基因苹果株系的抗旱能力显著增强（另文发表），再次证明了 *MdHYL*1 基因在干旱胁迫下起重要作用。进一步对转基因苹果表型进行观察，发现 *MdHYL*1 转基因苹果根系较未转基因的对照显著增多，而根系的发育与植物的抗旱能力具有明显的相关性，根系生长越茂盛则植株的抗旱能力越强，因此推测 *MdHYL*1 基因对于干旱的响应主要是通过促进根系的生长实现的。

由各个物种 HYL1 蛋白的序列比对结果发现，HYL1 蛋白在各物种中 N 端都比较保守，尤其是两个双链 RNA 结合结构域 DSRM，表明 *HYL*1 参与的 miRNA 合成过程中，结合双链 RNA 的特性在各个物种中都是比较稳定的。在拟南芥中，*HYL*1 参与了 miRNA 介导的各生理过程，从最初发现与 miRNA 合成直接相关[14]，到发现在 miRNA 合成过程中是通过与 *DCL1*[15-17]、*HEN1*[18-19]、*SE*[20-21]、*RCF3*[22] 等互作形成复合物来发挥作用，*HYL*1 在 miRNA 合成过程中的功能研究已经非常成熟。除了直接参与 miRNA 的合成及响应 IAA、CTK 和 ABA[6,23] 等植物生长激素的调节过程外，*HYL*1 还参与了 miRNA 介导的生理反应，如 *HYL*1 基因可以调控 miR156 的靶基因 *SPL* 基因的表达水平，从而调控 miR156 介导的拟南芥童期的营养生长过程[24]；此外，它还参与了 miRNA 介导的内源小孢子囊和雌蕊结构的调控[25]、叶片近轴和远轴同一性的平衡[26] 及气孔数目建成等生理过程[27]。以上研究表明，*HYL*1 通过调控 miRNA 的合成来参与各个生理过程。因此，苹果 *MdHYL*1 基因在干旱中的功能可能也是由某种 miRNA 介导的生理过程，这为进一步研究干旱过程中相关 miRNA 的变化提供了依据。

[参考文献]

[1] Wang R, Li L, Cao Z, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple *MdCIPK6L* gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79: 123-135.

[2] Zuo B, Zheng X, He P, et al. Overexpression of *MzASMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 57(4): 408-417.

[3] Wang R K, Zhong H C, Hao Y J. Overexpression of a R2R3 MYB gene *MdSIMYB*1 increases tolerance to multiple stresses in transgenic tobacco and apples [J]. Physiologia Plantarum, 2014, 150(1): 76-87.

[4] Dong Q L, Wang C R, Liu D D, et al. MdVHA-A encodes an apple subunit A of vacuolar H(+)-ATPase and enhances drought tolerance in transgenic tobacco seedlings [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(6): 601-609.

[5] Liao X, Guo X, Wang Q, et al. Overexpression of *MsDREB*6.2 results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants [J]. Plant J, 2017, 89(3): 510-526.

[6] Lu C, Fedoroff N V. A mutation in the *Arabidopsis HYL*1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin [J]. The Plant Cell, 2000, 12(12): 2351-2365.

[7] You C X, Zhao Q, Wang X F, et al. A dsRNA-binding protein MdDRB1 associated with miRNA biogenesis modifies adventitious rooting and tree architecture in apple [J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(2): 183-192.

[8] 赵先炎. 苹果 MdDRB1 基因及 2 个相关 MircoRNAs 编码基因的功能鉴定 [D]. 山东泰安：山东农业大学，2015.
Zhao X Y. Functional characterization of *MdDRB*1 and the two related MicroRNA genes [D]. Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 2015.

[9] 任怡然，赵　强，赵先炎，等. 苹果 *MdDRB*1 的表达与功能分析 [J]. 园艺学报，2016，43(6)：1033-1043.
Ren Y R, Zhao Q, Zhao X Y, et al. Expression and function analysis of apple *MdDRB*1 gene [J]. Acta Horticulturae Sinica,

2016,43(6):1033-1043.

[10] Dai H,Li W,Han G,et al. Development of a seedling clone with high regeneration capacity and susceptibility to agrobacterium in apple [J]. Sci Hortic (Amsterdam),2013,164:202-208.

[11] Chang S,Puryear J,Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Rep,1993,11(2):113-116.

[12] James D J,Passey A J,Barbara D J,et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector [J]. Plant Cell Reports,1989,7(8): 658-661.

[13] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method [J]. Methods,2001,25:402-408.

[14] Han M H,Goud S,Song L,et al. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(4):1093-1098.

[15] Kurihara Y,Takashi Y,Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis [J]. RNA,2006,12(2):206-212.

[16] Song L,Han M,Lesicka J,et al. *Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2007,104(13):5437-5442.

[17] Fang Y,Spector D L. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants [J]. Current Biology,2007,17(9):818-823.

[18] Baranauske S,Mickute M,Plotnikova A,et al. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase:HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins [J]. Nucleic Acids Research,2015,43(5):2802-2812.

[19] Vazquez F,Gasciolli V,Crete P,et al. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development,but not posttranscriptional transgene silencing [J]. Current Biology,2004,14(4):346-351.

[20] Yang L,Liu Z,Lu F,et al. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal,2006,47(6):841-850.

[21] Dong Z,Han M,Fedoroff N V. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,105(29):9970-9975.

[22] Karlsson P,Christie M,Seymour D K,et al. KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(45):14096-14101.

[23] Lesickagorecka J,Szarzynska B,Sawczak M,et al. Abscisic acid does not influence the subcellular distribution of the HYL1 protein from *Arabidopsis thaliana* [J]. Acta Biochimica Polonica,2008,55(3):517-524.

[24] Li S,Yang X L,Wu F et al. HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth [J]. Journal of Experimental Botany,2012,63(7):2787-2798.

[25] Lian H,Li X,Liu Z et al. HYL1 is required for establishment of stamen architecture with four microsporangia in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot,2013,64(11):3397-3410.

[26] Liu Z,Jia L,Wang H,et al. HYL1 regulates the balance between adaxial and abaxial identity for leaf flattening via miRNA-mediated pathways [J]. Journal of Experimental Botany,2011,62(12):4367-4381.

[27] Jovergil S,Candela H,Robles P,et al. The microRNA pathway genes *AGO*1,*HEN*1 and *HYL*1 participate in leaf proximal-distal,venation and stomatal patterning in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology,2012,53(7):1322-1333.