

‘库尔勒香梨’miR159家族成员进化特性及表达分析

马丽, 周丽, 徐航, 全绍文, 杨洁萍, 牛建新*

(石河子大学农学院园艺系·特色果蔬栽培生理与种质资源利用兵团重点实验室, 新疆石河子 832003)

摘要:【目的】了解‘库尔勒香梨’miR159家族成员的进化特征及其在萼片脱落与宿存中的作用。【方法】以‘库尔勒香梨’Small RNA高通量测序中获得的miR159家族前体序列和成熟体序列为基础进行系统发育树构建、前体和成熟体的序列比对、前体二级结构预测、WebLogo保守性分析、靶基因预测和表达量分析。【结果】‘库尔勒香梨’miR159家族存在2个前体成员(ψ-MIR159a、ψ-MIR159c)和2个成熟体成员(ψ-miR159a、ψ-miR159c)。2个前体成员的序列均能形成典型稳定的茎环结构,且序列完全一致,它们的最小折叠自由能(dG)都为-93.95 kcal·mol⁻¹。系统发育进化树显示,‘库尔勒香梨’和苹果MIR159家族亲缘关系很近。WebLogo分析表明,miR159家族成熟体的保守性很高,其保守序列为5'-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUAUU-3',但‘库尔勒香梨’的碱基保守性较低。靶基因预测显示,‘库尔勒香梨’miR159基因家族靶基因为转录因子bHLH91、BES1/BZR1同源蛋白4、热激70 ku蛋白质、Trihelix转录因子GT-1、G型凝集素S-受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶RLK1等。实时荧光定量PCR(qPCR)显示,‘库尔勒香梨’miR159家族的2个成员在初花期、盛花期和末花期3个时期萼片脱落组和宿存组的表达量有显著差异。【结论】‘库尔勒香梨’miR159家族在进化过程中既有保守性又有多样性,可能在萼片脱落过程中起作用。

关键词:‘库尔勒香梨’;miR159家族;进化特性;表达模式

中图分类号:S661.2

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2019)01-0001-10

Evolutionary characteristics and the expression patterns of miR159 gene family in ‘Kuerlexiangli’ pear

MA Li, ZHOU Li, XU Hang, QUAN Shaowen, YANG Jieping, NIU Jianxin*

(Department of Horticulture, College of Agriculture, Shihezi University / Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Special Fruits and Vegetables Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: 【Objective】MicroRNAs (miRNAs) are short, noncoding RNAs, about 20-24 nucleotides in length, with variable sequence complementarity to longer target RNAs. Many biological processes including fruit development, senescence, metabolism, hormone response and stress responses are regulated by miRNAs. MiR159 is a conserved, ancient and multi-regulatory gene family in plants. MiR159 has been found to be involved in the plant leaf morphogenesis, flower organ development, vegetative growth, anther development, seed morphology and germination and defense response. In addition, miR159 also has been observed to participate in plant biological and abiotic stresses, such as salt stress, high temperature stress, low temperature stress and mechanical stress. Studies have showed that miR159 has a wide range of regulatory effects in plants, especially in the development of flower organs. ‘Kuerlexiangli’ pear (*Pyrus sinkiangensis* Yu) is an ancient regional high-quality variety which is crisp and juicy. However, in recent years, as gradual increase of the planting area of ‘Kuerlexiangli’ pear, the fruit quality has gradually decreased, and the number of fruits with persistent calyx have increased, resulting in the decrease of flavor and quality of the fruits. Therefore, the study of the sequence characteristics, phylogenetic evolution, and expression patterns of the miR159 gene family is beneficial to the further exploration of the important regulatory role of miR159 in plants. What’s more, it is of great sig-

收稿日期:2018-07-16 接受日期:2018-09-25

基金项目:国家自然科学基金(31360474);高等学校博士学科点专项科研基金博导类联合资助课题(2013651810002)

作者简介:马丽,女,在读硕士研究生,研究方向为果树分子生物学。Tel:18299092322, E-mail:2606516390@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13999533176, E-mail:njx105@163.com

nificance to explore the roles of miR159 in regulating calyx persistence in ‘Kuerlexiangli’ pear. So, we explored the evolution characteristics and expression patterns of miR159 gene family in the ovaries and sepals of the ‘Kuerlexiangli’ pear fruits with a deciduous calyx and with a persistent calyx. **【Methods】** Two precursor sequence and two mature sequence of the ‘Kuerlexiangli’ pear miR159 family were obtained from a small RNA Illumina high-throughput sequencing. The miR159 precursor sequences and mature sequences of *Malus domestica*, *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*, *Vitis vinifera*, *Citrus reticulata*, *Prunus persica*, *Cucumis melo* and *Populus trichocarpa* were downloaded from the miRBase database (<http://www.mirbase.org/index.shtml>). The precursor sequence and mature sequence multi-sequence alignment of the miR159 family were analyzed using DNAMAN (ver. 6.0.3.99) software. MEGA 5.1 software was used to construct phylogenetic tree of the miR159 family in the plants including ‘Kuerlexiangli’ pear. The construction method was Neighbor-joining (NJ). The secondary structure prediction of the ‘Kuerlexiangli’ pear pre-miR159 family was performed using RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) was used to analyze the conservation of miR159 family in ‘Kuerlexiangli’ pear and some related plants. The ‘Kuerlexiangli’ pear transcriptome database was used as a candidate sequence for the prediction of the target gene, and the target gene of the Korla Fragrant miR159 family was predicted using psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) online software. The parameters were all default values. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using a CFX manager (Bio-Rad, USA) and the SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) to determine the expression profiles of miR159 in the ovaries and sepals of the ‘Kuerlexiangli’ pear fruits with a deciduous calyx and with a persistent calyx. **【Results】** The results show that the miR159 family of ‘Kuerlexiangli’ pear had two precursor members (psi-MIR159a, psi-MIR159c) and two mature members (psi-miR159a, psi-miR159c). RNAfold prediction results showed that the two precursors sequences of the miR159 family were able to form a typical stable stem-loop structure with a minimal folding free energies (dG) of $-93.95 \text{ kal} \cdot \text{mol}^{-1}$. And the sequences of the two members were identical. Phylogenetic tree analysis showed that all members of ‘Kuerlexiangli’ pre-miR159 gathered in different branches, and they were genetically close to *Malus domestica*. The Weblogo results showed that the conserved sequence of the miR159 family mature sequences was 5’-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUAUU-3’, with higher conservation at bases 2 to 19. The mature sequence of the ‘Kuerlexiangli’ miR159 family was less conserved, and conserved only at 5 bases. Target genes prediction of ‘Kuerlexiangli’ miR159 family showed that their annotation of targets included heat shock 70 ku protein (HSP70), trihelix transcription factor GT-1 (GT-1), transcription factor bHLH91 (BHLH91), protein argonaute 1 (AGO1), G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1(RLK1), revealing the universality of miR159 functionality. These predicted target genes were involved in flower organ development, hormone response, apoptosis, and stress response, being closely related to organ abscission. The qRT-PCR analysis indicated that the expression of miR159 family members had similar expression pattern. There were significant differences in the expression levels between ovaries and sepals of the fruits with a deciduous calyx and those with a persistent calyx. These results suggested that the ‘Kuerlexiangli’ pear miR159 family might be involved in the calyx persistence in ‘Kuerlexiangli’ pear. **【Conclusion】**This research showed that the ‘Kuerlexiangli’ pear miR159 family members exhibited both conservatism and diversity, and might be involved in calyx persistence in ‘Kuerlexiangli’ pear.

Key words: ‘Kuerlexiangli’ pear; miR159 family; Evolutionary characteristic; Expression pattern

自1993年Lee等^[1]发现秀丽隐杆线虫体内的lin4基因能够编码一类长度为22 nt的非编码RNA以来,目前miRBase(Release 22)已收录38 589条miRNA。miR159是一类古老的miRNA,是陆生植物中普遍存在且高度保守的基因家族^[2]。拟南芥中已知的miRNA有430个,然而只有miR156、miR159、miR172这3个miRNA家族与花期调控有关^[3]。其中miR159通过调控MYB转录因子等靶标,在植物叶片形态建成^[4]、花器官发育^[5]、营养生长^[2]、花药发育^[6]、种子形态及萌发^[7]、盐胁迫、高温胁迫和机械胁迫等生物及非生物胁迫^[8]、防卫反应^[9]中起着重要的作用。它还受脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)的诱导,参与花器官的发育^[10]。刘雪等^[11]通过人工microRNA技术与PCR技术克隆得到了701 bp的miR159片段,然后将获得的miR159片段通过双酶切后连接到植物表达载体pCPB121,构建了马铃薯amiR159表达载体。李晓燕等^[3]发现miR159介导的GAMYB转录因子表达可以调控大岩桐花期以及花器官的发育。在葡萄中,miR159的靶基因VvGAMYB通过赤霉素开花途径参与葡萄的开花过程^[12]。拟南芥中,miR159及其靶基因MYB65可以调控愈伤组织形成和离体再生,抑制拟南芥根尖分生组织细胞的分裂速率进而抑制主根的生长^[13]。郑聿贤^[14]发现,miR159高表达的转基因拟南芥具有明显的抗旱性,认为miR159具有抗旱功能。蒋有琦^[15]的研究也证明miR159能够通过参与ABA的信号通路进而参与抗旱。有研究表明,miR159位于miR156和miR167的上游,通过调控miR156和miR167的表达分别参与拟南芥花成熟发育及营养生长时间进程的调控^[16-17]。这一系列研究均表明,miR159在植物中具有广泛的调控作用,特别是在花器官的发育过程中调控作用更明显。关于miR159家族成员的研究在果树龙眼和葡萄中已有报道^[18-19],然而关于‘库尔勒香梨’miR159家族的研究还未发现。因此,对‘库尔勒香梨’miR159基因家族的分子特性和表达模式进行研究对于揭示萼片脱落宿存的分子机制具有重要意义。

‘库尔勒香梨’是新疆梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu)的栽培品种,原产于新疆巴音郭楞蒙古自治州和阿克苏等地,是古老的区域优质品种。近年来随着其种植面积的逐渐增加,果实品质却逐渐变差,宿萼果增多。‘库尔勒香梨’宿萼果外观畸形,果皮粗

糙,果心大,石细胞多,极大地影响了其风味和品质,损害了其市场形象,给果农造成了重大损失^[20]。miRNA作为植物非编码RNA研究的重要分支,探究其对‘库尔勒香梨’生长发育的调控具有重要意义。Pei等^[21]对‘库尔勒香梨’进行转录组和数字基因表达谱测序,为miRNA的研究提供了重要的参考数据。笔者课题组前期利用高通量测序技术对脱萼组和宿萼组样品构建的小分子RNA文库进行测序,筛选与萼片脱落和宿存相关的miRNA基因,发现了一些‘库尔勒香梨’中已知miRNA家族,并预测到了包括miR159在内的16个miRNA有可能与‘库尔勒香梨’萼片的脱落有关。然而仍未明确这些miRNA在‘库尔勒香梨’中的分子特性及表达模式。因此,笔者以‘库尔勒香梨’miR159的2条前体序列及2条成熟体序列为基础,进行了‘库尔勒香梨’miR159家族前体及成熟体序列分析、二级结构预测、系统进化树构建、序列保守性分析、靶基因预测及其在脱萼组和宿萼组的表达分析,为研究miR159家族在‘库尔勒香梨’果实中的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试材与取样

样品于2018年4月取自新疆库尔勒沙依东园艺场。田间观察经验显示‘库尔勒香梨’强势树第1序位花宿萼果率最高,弱势树第4序位花的脱萼果率最高^[22],因此笔者选择强势树和弱势树作为试验树,分别在初花期(全树5%花朵开放)、盛花期(全树50%花朵开放)和末花期(全树75%以上花凋落),采集强势树上的第1序位花为宿萼组,弱势树上第4序位花为脱萼组。去掉花瓣和花柄,并将其从萼片和子房交界处分割成两部分,分别用锡箔纸包好,记为脱萼组萼片(T_e)、脱萼组子房(T_z)、宿萼组萼片(S_e)、宿萼组子房(S_z)4组,迅速投入液氮中冻存,然后带回实验室保存于-70℃,为后续试验备用。

1.2 方法

1.2.1 植物miR159前体序列和成熟体序列的获取和分析 通过小RNA Illumina高通量测序获得‘库尔勒香梨’miR159家族成员的成熟体和前体序列。从miRBase数据库(<http://www.mirbase.org/index.shtml>)(Release 22)中下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、苹果(*Malus domestica*)、

碧桃(*Prunus persica*)、柑橘(*Citrus reticulata*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、毛果杨(*Citrus trifoliata*)、番木瓜(*Carica papaya*) 8 种植物 miR159 家族成员的前体序列和成熟体序列。miR159 家族的前体序列和成熟体序列采用 DNAMAN Version 6.0.3.99 软件进行分析。用 MEGA 5.1 软件构建 miR159 家族的前体序列和成熟体序列的系统进化树, 构建方法为邻近法(neighbor-joining, NJ), 并用自展法(Bootstrap) 1 000 次重复检验进化树。其余参数均选择默认值。使用 ViennaRNA 在线软件中的 RNAfold(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), 按其默认参数分析‘库尔勒香梨’MIR159 的二级结构。用 WebLogo 在线软件(<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 分析 miR159 家族碱基的保守程度, 并绘制序列 Logo 图。

1.2.2 ‘库尔勒香梨’miR159 家族的靶基因预测
以‘库尔勒香梨’无参转录组 unigene 数据库作为靶基因预测的候选序列, 用 psRNATarget(<http://plant-grn.noble.org/psRNATarget/>) 预测‘库尔勒香梨’miR159 家族的靶基因, 靶基因预测的期望值(Expectation) ≤ 3 , 其余参数均为默认值。

1.2.3 ‘库尔勒香梨’psi-miR159 家族在花的不同时期萼片和子房中的实时荧光定量分析
用 EASYspin Plant microRNA Kit(艾德莱)试剂盒提取总 RNA, 用 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit(TakaRa)进行 miRNA 的反转录, 利用 Primer 5.0 软件对 psi-miR159a、psi-miR159b 的序列设计 qPCR 的上游引物, 下游引物为反转录试剂盒中的通用下游引物(表 1)。采用 SYBR qPCR 技术, 对‘库尔勒香梨’花初花期、盛花期、末花期的 S_e、T_e、T_z、S_z 共 12 个样品进行实时荧光定量检测, 利用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 荧光染料在 CFX 96 touch 系统采集荧光信号, 每个反应 3 次重复, 相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法。选用 U6 为内参基因, 结果用 SPSS 17.0 进行方差分析($p < 0.05$), 使用 Excel 2010 作图。

表 1 ‘库尔勒香梨’psi-miR159 家族 qPCR 引物
Table 1 qPCR primers of ‘Kuerlexiangli’ pear psi-miR159 family

引物名称 Primer name	序列 Sequence
psi-miR159a	F:CGCGCTTGGATTGAAGGGAGCTCC
psi-miR159c	F:CGCGCGGAATTCCTCTCCTCTCCTTT
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCAC
U6	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT

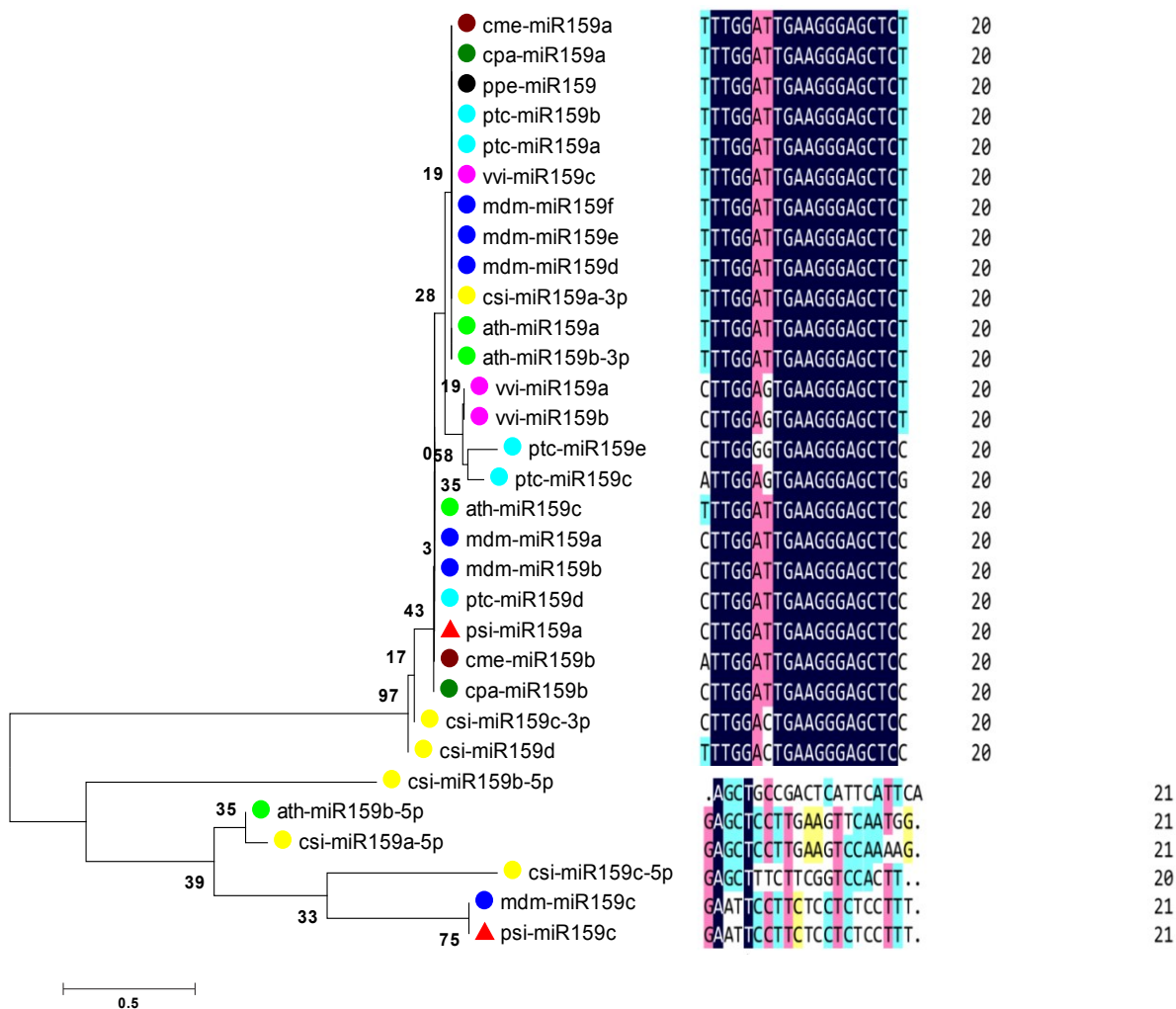
2 结果与分析

2.1 ‘库尔勒香梨’成熟体进化树与序列分析

从 miRBase 数据库中筛选 miR159 家族(图 1), 发现 miR159 广泛分布于 36 个物种, 共有 150 个成熟的家族成员, 在毛果杨、卷柏等古老植物中也存在, 说明 miR159 家族是一类进化古老的 miRNA 家族。不同物种的 miR159 家族成员数量相差很大, 大豆和欧洲云杉的数量最多, 有 11 条; 玉米次之, 有 10 条; 水稻有 6 条, 杨树和甘蔗有 5 条。通过小 RNA 高通量测序, 发现了‘库尔勒香梨’miR159 家族的 2 条成熟体, 分别命名为 psi-miR159a、psi-miR159c。基于草本模式植物拟南芥和木本模式植物毛果杨以及 6 种果树的 miR159 家族的成熟体构建进化树。结果显示, miR159 家族成员被分成了两大支, 其中一支由苹果、柑橘和梨的 miR159c 以及柑橘的 miR159b、miR159a 和拟南芥的 miR159b 组成, 剩下的成员则聚为另一大支。香梨的 2 个 miR159 家族成员位于 2 个不同的大分支上, 其中‘库尔勒香梨’与苹果的亲缘关系最近。序列比对发现, miR159 家族成员大多数为 20 nt, 少数为 21 nt, 其中‘库尔勒香梨’psi-miR159a 的长度为 20 nt, psi-miR159b 的长度为 21 nt。在进化树的大分支中, miR159 家族的碱基高度重合, 并且大多数 miR159 家族都具有相同的序列。说明了‘库尔勒香梨’与其他物种在进化过程中高度保守。在进化树的小分支中, miR159 家族成员的保守性很低, 说明 miR159 家族在进化过程中出现了功能分化。

2.2 ‘库尔勒香梨’miR159 家族前体序列分析及二级结构预测

通过小 RNA 高通量测序获得了‘库尔勒香梨’miR159 家族的 2 条前体序列, 分别命名为 psi-MIR159a 和 psi-MIR159c。它们的长度均为 169 nt, 序列比对显示两条前体序列完全一致(图 2), 但 psi-miR159 成熟体来源于前体的不同部位, 但都位于 5' 臂。使用 ViennaRNA 在线分析中的 RNAfold(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) 分析 miR159 前体的二级结构, 运行参数为默认值。结果显示香梨 miRNA 前体序列折叠后能够形成典型的稳定的发夹结构(图 3)。此外, ‘库尔勒香梨’psi-MIR156 家族不同成员的最小折叠自由能(ΔG)较小, $\Delta G = -93.95 \text{ kal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明‘库尔勒香梨’miR159 家族的成员结构均较为稳定。



psi. 库尔勒香梨; mdm. 苹果; ath. 拟南芥; cpa. 番木瓜; vvi. 葡萄; csi. 柑橘; ppe. 碧桃; cme. 甜瓜; ptc. 毛果杨。

psi. Kuerlexiangli pear; mdm. *Malus domestica*; ath. *Arabidopsis thaliana*; cpa. *Carica papaya*; vvi. *Vitis vinifera*; csi. *Citrus reticulata*; ppe. *Prunus persica*; cme. *Cucumis melo*; ptc. *Populus trichocarpa*.

图 1 miR159 家族成熟体进化树和序列比对

Fig. 1 Phylogenetic relationships and sequence alignment among plants miR159 sequences



图 2 ‘库尔勒香梨’ miR159 家族序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of miR159 sequences in ‘Kuerlexiangli’ pear

2.3 MIR159 基因家族系统发育进化树分析

从 miRBase 数据库获得苹果、葡萄、碧桃、番木瓜、拟南芥、甜瓜、柑橘和毛果杨 8 种植物的 MIR159 家族所有成员。利用 MEGA 5.1 软件对 MIR159 序列进行进化分析。从图 4 可以看出, MIR159 进化树主要分为 2 支,除了‘库尔勒香梨’的 MIR159 成员聚

集在一个分支中,其余 8 种植物的 MIR159 家族的不同成员都分散在不同的分支中,反映了植物 miR159 家族进化的多样性。从整体来看,‘库尔勒香梨’ MIR159 家族与苹果 MIR159 在进化过程中关系最近,推测‘库尔勒香梨’miR159 家族在进化过程中与苹果的进化方式接近。

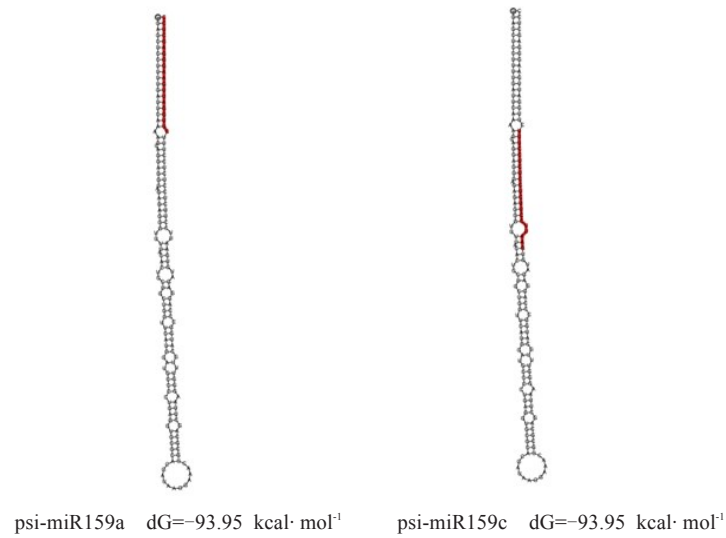
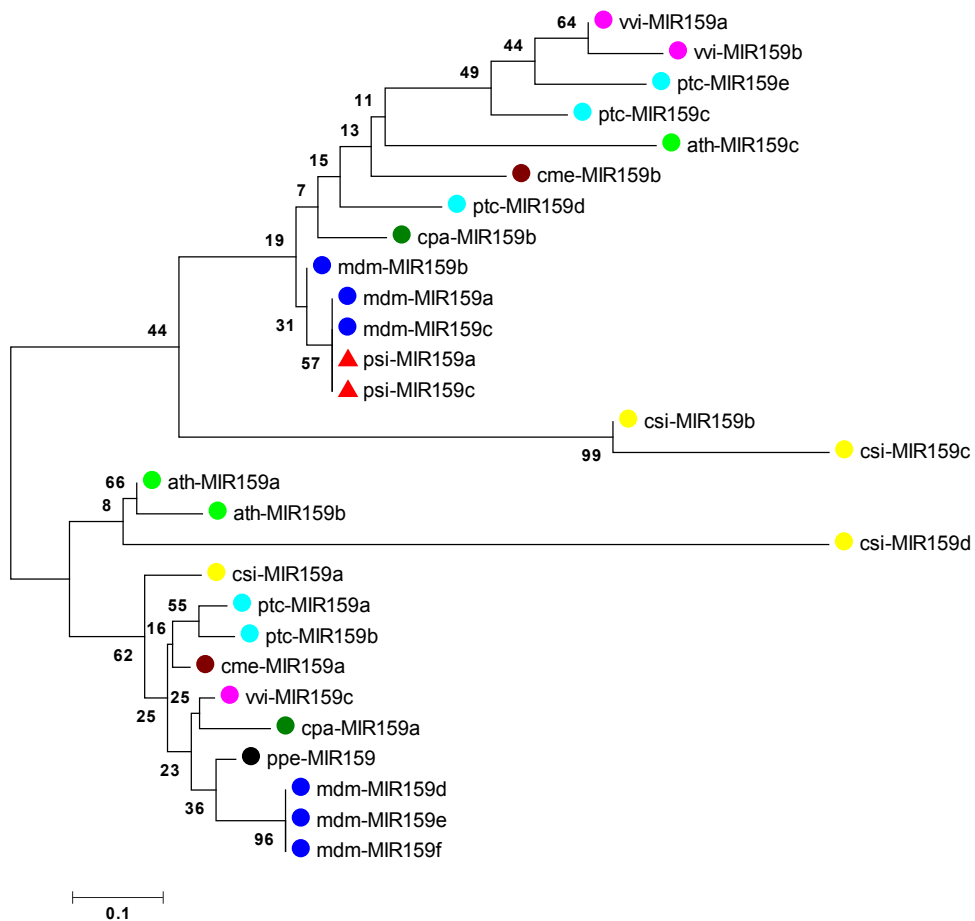


图 3 ‘库尔勒香梨’MIR159 二级茎环结构分析

Fig. 3 The stem-loop structure of psi-MIR159 in ‘Kuerlexiangli’ pear



psi. 库尔勒香梨; mdm. 苹果; ath. 拟南芥; cpa. 番木瓜; vvi. 葡萄; csi. 柑橘; ppe. 碧桃; cme. 甜瓜; ptc. 毛果杨。

psi. Kuerlexiangli pear; mdm. *Malus domestica*; ath. *Arabidopsis thaliana*; cpa. *Carica papaya*; vvi. *Vitis vinifera*; csi. *Citrus reticulata*; ppe. *Prunus persica*; cme. *Cucumis melo*; ptc. *Populus trichocarpa*.

图 4 植物 MIR159 进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of plant MIR159 sequences

2.4 miR159 基因家族系统发育进化树分析

对这9种植物的miR159家族成员以及‘库尔勒香梨’的2个家族成员的成熟体序列进行保守性分析。由WebLogo保守性分析看出,miR159家族成熟体的保守性很高,在第4位置处的保守性最高,且该位置全部为碱基U。在第16位保守性最低,碱基U和C出现的频率大致相等。整体来看,miR159家族成熟体的保守序列是5'-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA-3',在2到19位碱基处的保守性较高(图5)。

列的碱基保守性低,仅在5个碱基处保守(图6),说明‘库尔勒香梨’miR159家族在进化过程中出现了功能分化,并且可能发挥着不同的作用。

2.5 ‘库尔勒香梨’miR159靶基因预测

以‘库尔勒香梨’转录组 unigene 为靶标预测的数据库,采用 psRNATarget 软件在线预测该家族的靶基因。由表2可知,‘库尔勒香梨’的 miR159a 和 miR159c 的靶基因并不相同,psi-miR159a 的靶基因为含 KH 结构域的蛋白质 At2g38610, BES1/BZR1 同源蛋白4和未表征的蛋白 PAM68。psi-miR159c 的



图5 植物 miR159 家族成员成熟序列的碱基保守性分析

Fig. 5 Analysis of base conservation of mature sequences in plant miR159 family members



图6 ‘库尔勒香梨’miR159 家族成员成熟序列的碱基保守性分析

Fig. 6 Analysis of base conservation of mature sequences in ‘Kuerlexiangli’ pear miR159 family members

表2 ‘库尔勒香梨’miR159 家族不同成员靶标预测

Table 2 Targets prediction of ‘Kuerlexiangli’ pear miR159 family

miRNA 名称 miRNA name	靶标基因 Target gene	抑制 Inhibition
psi-miR159a	未表征的蛋白 PAM68 Uncharacterized protein PAM68-like(At5g52780)	Translation
	BES1/BZR1 同源蛋白4 BES1/BZR1 homolog protein 4(BEH4)	Translation
	含 KH 结构域的蛋白质 At2g38610 KH domain-containing protein At2g38610(At2g38610)	Cleavage
psi-miR159c	热激蛋白 70 Heat shock 70 ku protein(HSP70)	Cleavage
	可能的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 5(RDR5) Probable RNA-dependent RNA polymerase 5	Cleavage
	血红素合成酶 Siroheme synthase (cysG)	Cleavage
	Trihelix 转录因子 GT-1 Trihelix transcription factor GT-1 (GT-1)	Translation
	转录因子 bHLH91 Transcription factor bHLH91 (BHLH91)	Cleavage
	双特异性 RNA 甲基转移酶 RlmN Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN (rlmN)	Cleavage
	可能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 At1g54610 Probable serine/threonine-protein kinase At1g54610(At1g54610)	Cleavage
	G 型凝集素 S-受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RLK1 G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1(RLK1)	Cleavage
蛋白质 argonaute 1 Protein argonaute 1 (AGO1)	Cleavage	

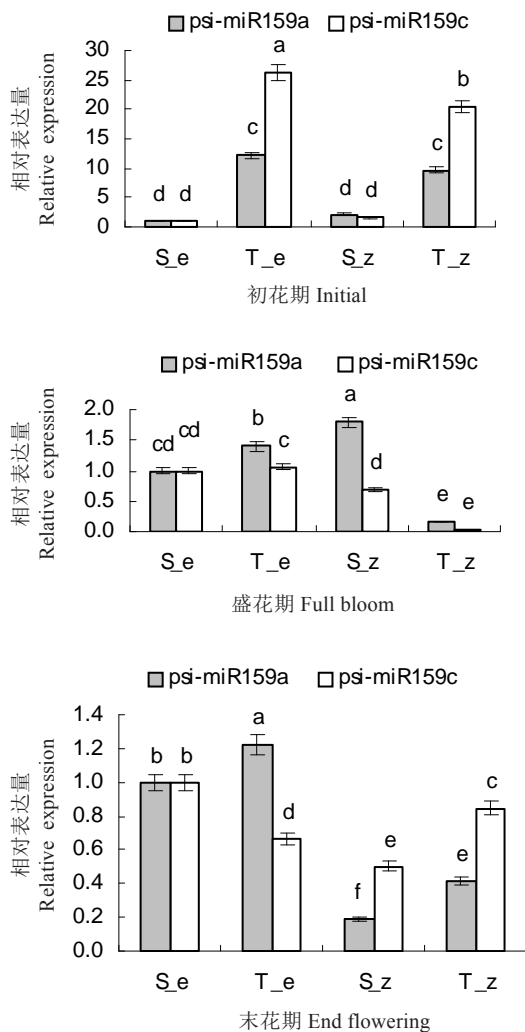
注: Cleavage. 裂解靶标; Translation. 抑制靶标的翻译。

Note: Cleavage indicates miR159 regulate targets by cleaving the mRNA at complementary base pairs; Translation indicates miR159 regulate the expression of their target genes following translation inhibition.

靶基因为 BES1/BZR1 转录因子、转录因子 BHLH、热激蛋白 70(HSP70)、转录因子 GT-1、G 型凝集素 S-受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RLK1(GsSRK)以及 AGO1 蛋白等。本研究揭示了‘库尔勒香梨’miR159 家族在进化过程中的功能分化。

2.6 psi-miR159 家族不同成员在‘库尔勒香梨’花期脱萼组和宿萼组中的表达分析

由图 7 可知,除了盛花期 S_e 和 T_e 中 psi-



S_e、T_e、S_z、T_z 表示宿萼组萼片、脱落组萼片、宿萼组子房、脱落组子房。不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

S_e、T_e、S_z、T_z indicate sepals of flowers with persistent calyx, sepals of flowers with deciduous calyx, ovaries of flowers with persistent calyx, ovaries of flowers with deciduous calyx. Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

图 7 psi-miR159a、psi-miR159c 在脱萼组和宿萼组子房、萼片不同花期的表达情况

Fig. 7 Expression pattern of psi-miR159a, psi-miR159c in ovary, sepal during different periods of florescence in flowers with persistent and deciduous calyx

miR159c 的表达量没有显著差异外,其余脱萼组和宿萼组中 psi-miR159c 和 psi-miR159a 的表达量均有显著差异。

3 讨 论

通过对‘库尔勒香梨’进行小 RNA Illumina 高通量测序,发现‘库尔勒香梨’中存在 miR159 家族的 2 个成员 psi-miR159a 和 psi-miR159c,进一步的研究发现,‘库尔勒香梨’的 miR159 家族保守性与多样性并存,并且与苹果的亲缘关系最近。通过对其在‘库尔勒香梨’花期萼片脱落组和宿存组进行表达量分析,发现除了盛花期的脱萼组子房外,psi-miR159a 在初花期和末花期脱萼组萼片和子房中表达量均显著增加,除了盛花期的脱萼组萼片、子房和末花期的脱萼组萼片外,psi-miR159c 在其余各时期的脱萼组萼片、子房中表达量均显著增加。推测‘库尔勒香梨’miR159 家族可能在萼片脱落过程中发挥作用。

miR159 是植物 21 类较为保守的 miRNA 基因家族中的一类^[23],对植物生长发育具有非常重要的调控作用。本研究通过 Small RNA 测序在‘库尔勒香梨’中发现 miR159 家族中的 2 个成熟体序列和 2 个前体序列,并从 miRBase 数据库中搜索其他植物的 miR159 家族成员,对‘库尔勒香梨’miR159 家族的进化特性进行分析。结果发现 miR159 家族在不同物种中具有高度保守性,但又存在多样性。前人研究中的大量证据表明植物 miR159 是一个保守、古老并具有多调控功能的基因家族^[18-19],本研究从 miRBase 数据库中筛选获取不同物种全部 miR159 成熟体序列,分析结果与前人一致,除了在苔藓植物中没有分布外,在被子植物、裸子植物等高等植物以及古老的蕨类植物中都有发现^[24]。在‘库尔勒香梨’miR159 家族中发现 2 个成熟体成员与 2 个前体成员,均可以形成稳定的茎环结构,并且成熟序列都位于二级茎环结构臂上。对成熟体序列比对显示 miR159 家族的碱基高度重合,上述结果均体现了‘库尔勒香梨’miR159 是一个保守并古老的基因家族。然而,miR159 家族在进化过程中也具有多样性。本研究通过 miR159 家族成员序列比对,发现 miR159 成熟体在长度上出现了差异,并且‘库尔勒香梨’miR159 两条序列的碱基差异很大;此外,在植物中,miR159 通过调控 MYB 家族转录因子的表达,从而调控植物的生长发育。本研究预测发现

miR159家族成员还可以靶向不同功能的蛋白,且高通量测序分析和qPCR结果也显示出‘库尔勒香梨’miR159的2个成员在脱落组和宿存组的萼片和子房中的表达量具有显著差异等,这些结果也体现了miR159的进化多样性。

研究发现,miR159的成熟体序列和miR319的成熟体序列同源性很高,两者序列21个碱基中有17个相同,miR319可以靶向调控miR159的靶基因,miR159c也被预测能够调控2个TCP家族成员基因,但其表达量非常低^[25]。在‘库尔勒香梨’中,笔者同样检测到miR319,同时也检测到miR319对应的基因座。除了‘库尔勒香梨’外,在miRBase 22上发现其他植物中也存在miR319。在miRBase数据库和其他的一些研究中,miR159和miR319被归为一类miRNA家族。研究表明,miR159和miR319从一个共同的祖先演化而来,然后通过基因的重复和丢失,形成了苔藓、石松类植物、裸子植物和被子植物特有的分支^[26]。

miRNA主要通过抑制靶基因的翻译或者对靶基因特异性切割来行使其功能。miR159的靶基因主要是MYB转录因子,MYB参与植物次生代谢^[27],激素和环境因子应答^[28],细胞分化、细胞周期^[29]以及叶片等器官的形态建成^[30]等过程的调节,同时它也能够对植物器官脱落产生影响^[31]。在本研究中,以‘库尔勒香梨’转录组 unigene 为靶标预测的数据库,预测到的‘库尔勒香梨’miR159家族的靶基因没有MYB转录因子,靶标预测显示‘库尔勒香梨’miR159靶向 BES1/BZR1 转录因子、转录因子 BHLH、热激蛋白 70(HSP70)、转录因子 GT-1、G 型凝集素 S-受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RPK1 (GsSRK)、AGO1 等。这些预测到的靶基因涉及花器官的发育、激素应答、细胞凋亡、胁迫应对,这些都与植物器官的脱落密切相关,qPCR 结果也显示,miR159在3个时期脱萼组和宿萼组的表达量均有显著的差异。推测‘库尔勒香梨’miR159可能在‘库尔勒香梨’萼片脱落过程中起重要的作用。该研究结果将为进一步鉴定‘库尔勒香梨’miR159在萼片脱落中的作用奠定基础。

4 结 论

‘库尔勒香梨’miR159家族在进化过程中既有保守性又有多样性,且在萼片脱落过程中发挥作用。

参考文献 References:

- [1] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] ALLEN R S, LI J, STAHL M I, DUBROU A, GUBLER F, MILLAR A A. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(41): 16371-16376.
- [3] 李晓燕. miR159 和 miR172 表达对大岩桐花发育的调控作用及其机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.
LI Xiaoyan. Function and regulatory mechanism of miR159 and miR172 in floral development in gloxinia (*Sinningia speciosa*) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [4] PALATNIK J F, ALLEN E, WU X L, SCHOMMER C, SCHWAB R, CARRINGTON J C, WEIGEL D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs [J]. *Nature*, 2003, 425 (6955): 257-263.
- [5] DAI H, LI W, MAO W, HAN G, ZHAO K, LIU Y, ZHANG Z. Development of an efficient regeneration and Agrobacterium-mediated transformation system in crab apple (*Malus micromalus*) using cotyledons as explants [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2013, 50(1): 1-8.
- [6] MILLAR A A, GUBLER F. The Arabidopsis GAMBYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 705-721.
- [7] REYES J L, CHUA N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination [J]. *Plant Journal*, 2007, 49(4): 592-606.
- [8] CHAO S, QIANG Z, DANDAN L, CHUNXIANG Y, YUJIN H. Ectopic expression of the apple Md-miRNA156h gene regulates flower and fruit development in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2013, 112(3): 343-351.
- [9] LI X Y, BIAN H W, SONG D F, M S Y, HAN N, WANG J H, ZHU M Y. Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression [J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(5): 791-799.
- [10] ACHARD P, HERR A, BAULCOMBE D C. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA [J]. *Development*, 2004, 131(14): 3357-3365.
- [11] 刘雪, 杨江伟, 唐勋, 张宁, 文义凯, 周香艳, 司怀军. 马铃薯 miR159 的克隆及人工表达载体构建 [J]. *分子植物育种*, 2016, 14(10): 2659-2664.
LIU Xue, YANG Jiangwei, TANG Xun, ZHANG Ning, WEN Yikai, ZHOU Xiangyan, SI Huaijun. Cloning and construction of artificial expression vector of Potato miR159 [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(10): 2659-2664.
- [12] 王梦琦, 解振强, 孙欣, 李晓鹏, 朱旭东, 王晨, 房经贵. 葡萄 miR159 及其靶基因 VvGAMBYB 在花发育过程中的作用分析

- [J]. 园艺学报, 2017, 44(6): 1061-1072.
- WANG Mengqi, XIE Zhenqiang, SUN Xin, LI Xiaopeng, ZHU Xudong, WANG Chen, FANG Jinggui. Function analysis of miR159 and its target gene VvGAMYB in grape flower development [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(6): 1061-1072.
- [13] 薛涛. 拟南芥 miR159 及其靶基因调控离体苗再生的作用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- XUE Tao. Research of miR159 and its targets in regulating *in vitro* shoot regeneration of *Arabidopsis thaliana* [D]. Jinnan: Shandong University, 2017.
- [14] 郑聿贤. miR159 的克隆及抗旱性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- ZHENG Yuxian. Cloning and research on the drought resistance of miR159 [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014.
- [15] 蒋有琦. miR159 调节植物抗旱分子机制研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- JIANG Youqi. Mechanism of miR159-mediated drought resistance in *Arabidopsis* [D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2017.
- [16] GUO C, XU Y, SHI M, LAI Y, WU X, WANG H, ZHU Z, PO-ETHIG R S, WU G. Repression of miR156 by miR159 regulates the timing of the juvenile-to-adult transition in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2017, 29(6): 1293-1304.
- [17] RUBIO-SOMOZA G, WEIGEL D. Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three MicroRNAs [J]. PLoS Genetics, 2013, 9(3): e1003374.
- [18] 陈旭, 曾友竞, 王嘉毅, 陈晓慧, 徐小萍, 李汉生, 张梓浩, 陈裕坤, 赖钟雄, 王天池, 林玉玲. 龙眼 miR159 家族成员进化特性及时空表达 [J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(4): 602-608.
- CHEN Xu, ZENG Youjing, WANG Jiayi, CHEN Xiaohui, XU Xiaoping, LI Hansheng, ZHANG Zihao, CHEN Yukun, LAI Zhongxiong, WANG Tianchi, LIN Yuling. Evolutionary characteristics of miR159 gene family in *Dimocarpus longan* Lour., and their spatial and temporal expression [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2017, 23(4): 602-608.
- [19] 葛金涛, 王丽丽, 赵统利, 刘兴满. 葡萄 miR159 家族生物信息学分析及靶基因预测分析 [J]. 江西农业学报, 2018, 30(2): 21-25.
- GE Jintao, WANG Lili, ZHAO Tongli, LIU Xingman. Bioinformatics analysis of miR159 family and prediction of its target genes in grape (*Vitis vinifera*) [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2018, 30(2): 21-25.
- [20] QI X X, WU J, WANG L F, LI L T, CAO Y F, TIAN L M, DONG X G, ZHANG S L. Identifying the candidate genes involved in the calyx abscission process of 'Kuerlexiangli' (*Pyrus sinkiangensis* Yu) by digital transcript abundance measurements [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 727.
- [21] PEI M S, NIU J, LI C J, CAO F J, QUAN S W. Identification and expression analysis of genes related to calyx persistence in Korla fragrant pear [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 132.
- [22] 孙晓霞, 牛建新, 王博慧, 裴茂松, 李陈静, 曹福军. '库尔勒香梨' 脱萼组与宿萼组样品差异表达基因的筛选 [J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1020-1027.
- SUN Xiaoxia, NIU Jianxin, WANG Bohui, PEI Maosong, LI Chenjing, CAO Fujun. Screening of differentially expressed genes in 'Korla fragrant pear' flower samples with persistent or deciduous calyx [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1020-1027.
- [23] CHEN X. Small RNAs and their roles in plant development [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2009, 25(1): 21-44.
- [24] 陈旭, 王嘉毅, 张梓浩, 王天池, 赖钟雄, 林玉玲. 植物 miR159 家族成员分子特性及其进化规律研究 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(7): 1286-1295.
- CHEN Xu, WANG Jiayi, ZHANG Zihao, WANG Tianchi, LAI Zhongxiong, LIN Yuling. Molecular characteristics and evolution of miR159 family members [J]. Journal of Northwestern Botany, 2017, 37(7): 1286-1295.
- [25] JAVIER F P, HEIKE W, CARLA S, REBECCA S, JEROME B, RAMIRO R, NORMAN W, EDWARDS A. Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* MicroRNAs miR159 and miR319 [J]. Developmental Cell, 2011, 13(1): 115-125.
- [26] LI Y, LI C Q, DING G H, JIN Y X. Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11(1): 122.
- [27] UIMARI A, STROMMER J. Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes [J]. Plant Journal, 1997, 12(6): 1273-1284.
- [28] LEA U S, SLIMESTAD R, SMEDVIG P. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway [J]. Planta, 2007, 225(5): 1245-1253.
- [29] SUO J F, LIANG X O, PU L, ZHANG Y, XUE Y. Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1630(1): 25-34.
- [30] YANG X Y, LI J G, PEI M, GU H, CHEN Z L, QU L J. Over-expression of a flowerspecific transcription factor gene AtMYB24 causes aberrant anther development [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(2): 219-228.
- [31] WANG B H, SUN X X, DONG F Y, ZHANG F, NIU J X. Cloning and expression analysis of an MYB gene associated with calyx persistence in Korla fragrant pear [J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(8): 1333-1341.