果 树 学 报 2019,36(7):846-856
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190077

miR403分子进化特性及其在龙眼体胚发生早期的表达模式分析

苏立遥,蒋梦琦,黄倏祺,徐小萍,厉 雪,陈 旭,赖钟雄,林玉玲*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所,福州 350002)

摘 要:【目的】探究miR403的分子进化特性及其在龙眼体胚发生早期中的表达模式。**【方法】**根据龙眼转录组数据库结合miRBase数据库下载得到植物miR403成熟体(miRNA,MicroRNA)和前体(pre-miRNA,Precursor MicroRNA)序列,对其构建系统发育树、序列多重比对、前体二级结构分析;并克隆龙眼miR403 5’末端cDNA序列,比较miR403启动子顺式作用元件。利用qPCR(Quantitative real time-PCR)探究龙眼体胚发生早期miR403和pre-miR403的表达模式。**【结果】**龙眼及其他17个物种中miR403的36个前体和42成熟体序列的系统发育树以及序列多重比对显示,植物miR403高度保守且主要来源于pre-miR403的3臂,而pre-miR403分歧较大,序列仅在miRNA生成区域保守;不同物种之间miR403成员数量差异不大;pre-miR403最小折叠自由能为-35.70 ~ -55.50 kal · mol^{-1}。克隆获得龙眼pri-miR403(miR403初级体)5’末端cDNA序列,确认其第一个碱基A为转录起始位点(TSS,transcription start site)。龙眼等5种植物*MIR403*启动子中具有大量光、激素和逆境胁迫等元件。龙眼早期体胚发生过程中miR403和pre-miR403整体为显著下调趋势。**【结论】**龙眼miR403与其他植物miR403具有高度的保守性以及物种之间的特异性,miR403和pre-miR403下调表达可能有利于促进龙眼早期体胚发生。

关键词:龙眼;microRNA403;进化特性;启动子;体胚发生;表达分析

中图分类号:S667.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)07-0846-11

Analysis of the molecular evolution characteristics of miR403 and its expression pattern during early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan*

SU Liyao, JIANG Mengqi, HUANG Shuqi, XU Xiaoping, LI Xue, CHEN Xu, LAI Zhongxiong, LIN Yuling*

(*Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China*)

Abstract:【Objective**】**MiR403, a miRNA family unique to dicotyledonous plants, plays an important role in plant disease resistance, growth and development. Previous studies showed that miR403 guided cleavage *AGO2* mRNA at transcription level, which played an significant role in defensing virus. In addition, miR403 could response to stress and express specifically in different organization. Besides, when over-expressed miR403, tomato showed slow growth, dwarfism, delayed flowering, and poor fertility. *Dimocarpous* longan, a member of the Sapindaceae family, was an important economic fruit tree in the subtropics. According to the previous researches, miRNA is important to longan somatic embryogenesis (SE). However, plants miR403 evolutionary characteristics and its function in plants somatic embryos have not been reported yet. Therefore, we investigated the molecular evolution characteristics of plant miR403 and its expression profile during longan early SE.**【**Methods**】**Plant miR403 matures (miRNA) and precursors (pre-miRNA) sequences were obtained from longan transcriptome database and miRBase database. The secondary structure analysis of plant pre-miR403 sequences were per-

收稿日期:2019-02-27 接受日期:2019-04-16

基金项目:国家自然科学基金(31672127);福建省高原学科建设经费(102/71201801101);福建农林大学园艺学院优秀硕士学位论文资助基金(2018S02)

作者简介:苏立遥,男,在读硕士研究生,研究方向为果树生物技术。Tel:18120821609,E-mail:591341454@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13067305211,E-mail:buliang84@163.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

formed by Mfold online software. The phylogenetic tree of plant miR403 and pre-miR403 were performed by MEGA 7.0 through NJ method (Neighbor-joining) with 1000 bootstrap. In addition, the sequences multiple alignment were carried out by iTOL and WebLogo softwares. RLM-RACE (RNA ligase-mediated amplification of cDNA ends) was used to obtain longan miR403 5’ cDNA (coding DNA) end sequence. The cDNA of RLM-RACE was synthesized using Gene Racer kit. DNAMAN 6.0 was used to design the primers of RLM-RACE. Based on the longan miR403 transcription start site (TSS), the promoter sequence was extracted of 2 800 bp upstream from the TSS. The promoter of ath-miR403 was collected from NCBI according to the pri-ath-miR403 (primary-ath-miR403) loading in NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Then, the TSS of citrus, soybean and grape miR403 members were predicted by BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) and the TSSP (www.softbreey.com) software and promoter sequences were extracted form their genome. Next, five plant miR403 promoters *cis*-acting elements were predicted using PlantCARE database. Finally, the expression patterns of miR403 and pre-miR403 during longan early SE were verified by SYBR Prumix EX TaqTMII kit, Tip-mix kit and Roche LightCycler 480 real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of miR403 was corrected by U6SnRNA, miR408-5p1 and ath5.8S*, and the expression of pre-miR403 was corrected by *FSD*, *EF-1α* and *EIF-4α*. The expressions profiles of miR403 and pre-miR403 were obtained by $2^{-\Delta Ct}$ method. The statistical analysis miR403 and pre-miR403 relative expression were performed through SPSS19.0 software.【Results】In this study, phylogenetic tree of 36 pre-miR403s and 42 miR403s sequences from longan and other 17 species showed that plant miR403 was a highly conserved miRNA family, and there was no significant difference in the number of miR403 among different species. MiR403 was mainly derived from the 3-terminal arm of pre-miR403, and only a few was derived from the 5-terminal arm of pre-miR403. The minimum folding free energy of plant pre-miR403s was from −35.70 kal · mol^{-1} to −55.50 kal · mol^{-1}. After amplifying the 5’ end cDNA sequence of longan miR403 by RLM-RACE technology, a 154 bp cDNA fragment without 3’ end sequence was obtained, and it was confirmed that the first base A was the TSS. The TSS of soybean, citrus and grape were predicted by the BDGP and the TSSP softwares. Then, we extracted *MIR403* promoter from longan, *Arabidopsis thaliana,* soybean, citrus and grape genome databases for analyzing the *csi*-acting elements. The results showed that the promoters had a large number of conserved elements such as light responsiveness elements, hormone responsiveness elements and stress responsiveness elements, implying that the regulatory factors of miR403 was common in different species. qPCR analysis showed that the expression levels of miR403 and pre-miR403 was significant decreased in longan early SE, suggesting that down-regulation of miR403 and pre-miR403 would be possible to mediate longan early SE.【Conclusion】Our researches showed that plant miR403s was highly conserved. In addition, the down regulation of pre-miR403 and miR403 might be promotive to longan early SE.

Key words: *Dimocarpus longan*; microRNA403; Evolution characteristics; Promoter; Somatic embryogenesis; Expression analysis

龙眼（*Dimocarpus longan* Lour.）为无患子科亚热带常绿果树。中国作为龙眼的主要栽培地区，栽培面积和产量分别占世界总量的70%和50%以上[1]。龙眼作为多年生木本植物，具有遗传转化困难、生长周期长、合子胚取材困难等问题。然而，龙眼体胚发生体系的建立为研究龙眼的生长发育提供了良好的平台。同时，体细胞胚胎发生体系与自然状态下合子胚发育过程极其相似。因此，采用体细胞胚胎发生体系研究其生理生化或调控机理以期为自然状态下合子胚发生提供借鉴。

MicroRNA（miRNA）是一种长度为18~24 nt的内源非编码的调控物质。研究表明，miRNA自植物

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

合子胚发育伊始便具有重要的作用[2]。同时，在体胚发生过程中大量miRNA被发现具有重要的调控作用。Lin等[3-5]发现miR160、miR167和miR390分别调控*ARF*（auxin response factors）家族成员参与到龙眼体胚发生过程中。miR159调控其靶标*MYB33*参与落叶松体胚发生[6]；miR171家族成员均可能参与龙眼[7]和百合[8]体胚的形态建成。另外，在拟南芥[9]、落叶松[10]、龙眼[11]等植物体胚中发现大量表达的miRNA，显示miRNA在植物体胚发生过程中具有重要作用。与古老的miRNA不同，miR403作为双子叶植物特有的miRNA家族[12-13]，通过调控靶标*AGO2*作为抵抗病毒的重要屏障[14-16]。同时，miR403在抵抗胁迫和调控植物生长发育中也具有重要作用[17-18]。随着植物全基因组工作的展开，miR403在毛果杨[19]、柑橘[20]、葡萄[21]、大豆[22]等植物中均被发现。然而，关于miR403的进化特性以及在植物体胚中的研究还未见报道。因此，为全面了解miR403在植物中的进化特性及其在龙眼早期体胚中的表达模式，笔者以龙眼miR403为主要研究对象，结合其他植物miR403家族成员，构建龙眼及其他植物miR403和pre-miR403序列的系统发育树，并进行序列多重比较和二级结构分析，以阐述miR403的分子和进化特性。进一步克隆龙眼pri-miR403 5’cDNA末端序列和鉴定龙眼*MIR403* TSS，在龙眼基因组[23]中提取其启动子序列，与拟南芥、大豆、柑橘和葡萄*MIR403*启动子序列进行顺式作用元件分析。最后，检测miR403与pre-miR403在龙眼体胚发生早期过程中的表达模式，以期为miR403在植物体胚或胚胎发育中的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以福建农林大学园艺植物生物工程研究所保存的龙眼‘红核子’胚性愈伤组织（EC）为初始材料，在MS液体培养基中处理0、1、3、6、9和12 d得到龙眼早期体胚发生过程的材料。以上材料均培养于25 ℃，黑暗环境中且取样后用液氮快速冷冻，保存于−80 ℃冰箱中以供实验使用。

1.2 方法

1.2.1 *龙眼及其他植物*miR403*前体、成熟体的下载* 龙眼miR403成熟体及前体序列下载于龙眼转录组数据库[11]。根据miRBase数据库（release 22.0）下载得到17个物种miR403家族的35个pre-miR403和41个miR403序列。

1.2.2 *龙眼及其他植物*pre-miR403*及*miR403*序列结构和分子特性分析及进化树构建* 首先，对所得的龙眼和其他17个物种pre-miR403和miR403家族成员分布与数量进行分类和统计；使用Mfold在线网站对植物pre-miR403序列进行二级结构和最小折叠自由能分析。其次，利用MEGA7.0，采用邻近法（Neighbor- joining，NJ）对植物miR403和pre-miR403序列构建系统发育树，设置自展法系数（Bootstrap）重复检验1 000次。最后，通过iTOL和WebLogo分别对植物miR403和pre-miR403序列进行多重比较。

1.2.3 *龙眼*pri-miR403 5’cDNA*末端序列的克隆* 根据龙眼pre-miR403序列，设计2条RLM-RACE引物（表1），采用GeneRacerTM Kit试剂盒，按照说明将龙眼EC、ICpEC（不完全胚性紧实结构，Incomplete compact pro-embryogenic cultures）和GE（球形胚，Globular embryos）的RNA混合，合成RLM-RACE所需的cDNA。通过RLM-RACE获得龙眼pri-miR403 5’RACE末端序列，验证其TSS。

1.2.4 *MIR403转录起始位点及启动子顺式作用元件分析* 根据龙眼*MIR403*的TSS，在龙眼基因组[23]中提取得到TSS上游2 800 bp的启动子序列。拟南芥*MIR403*启动子序列（2 800 bp）下载于NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/），通过葡萄基因组数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）、柑橘基因组数据库（http://citrus.hzau.edu.cn/orange/）、大豆基因组数据库（https://phytozome.jgi.doe.gov/）确定miR403的基因座，并采用BDGP（http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html）对大豆、葡萄和柑橘的*MIR403*的转录起始位点进行预测，通过TSSP（www.softbreey.com）对BDGP预测到的可信度较低的结果进行二次预测。提取转录起始位点前2 800 bp作为启动子序列。采用PlantCARE分析龙眼、拟南芥、大豆、柑橘和葡萄*MIR403*启动子的顺式作用元件。

1.2.5 *实时荧光定量PCR分析* 利用qPCR技术检测龙眼miR403和pre-miR403在龙眼体胚发生过程中的表达模式。试验采用Trzol试剂盒按照说明书提取上述龙眼体胚材料总RNA，并利用TransScript miRNA First- Strand cDNA Synthesis SuperMix

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（Trans）和PrimeScript® RT reagent Kit（TaKaRa）试剂盒，按照其说明书进行RNA逆转录，得到miR403和pre-miR403定量所需cDNA。miR403及pre-miR403定量引物见表1。

使用罗氏LightCyclers 480仪器、Tip-mix（Trans）试剂和SYBR Prumix EX Taq™ II（TaKaRa）试剂分析miR403和pre-miR403表达模式。采用Lin等[24]构建的qPCR体系，分别以U6SnRNA、miR408-5p1、Ath5.8S*和*Fe-SOD*、*EF-1α*、*EIF-4α*为内参基因对miR403和pre-miR403表达量进行校正，根据$2^{-\Delta Ct}$法得到miR403及pre-miR403的相对表达量。最后，利用SPSS19.0软件对miR403和pre-miR403的表达量进行差异显著分析。以上所有引物均采用DNAMAN6.0设计，由铂尚公司合成。

表1　本试验所使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	用途 Use
Pri-miR403-5R1	CCCGAGTTTGTGCGTGAATCT	miR403 5’末端扩增引物 5’RACE of miR403
Pri-miR403-5R2	GGTGCGTGAATCTAATGTAAACC	
Uni-primer5R1	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	通用引物 Universal primer
Uni-primer5R2	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	
miR403	TTAGATTCACGCACAAACTCG	qPCR
Q-pre-miR403F	CTATCTCAAGTTTGTCCGTGAATC	
Q-pre-miR403R	CGAGTTTGTGCGTGAATCTAATG	

注：引物序列中阴影部分碱基为人为添加碱基。

Note: The shaded base in the primers is artificial added.

2　结果与分析

2.1　龙眼及其他植物miR403和pre-miR403分布及数量分析

为比较龙眼及其他植物miR403的序列差异，笔者对龙眼在内的11个科共18个物种的36个pre-miR403和42个miR403序列（表2）。这18个物种均属于被子植物门双子叶植物纲。进一步表明，miR403为双子叶植物特有的miRNA，提示其随着双子叶植物进化而来，进化时间较短，在植物界中分布范围较小。

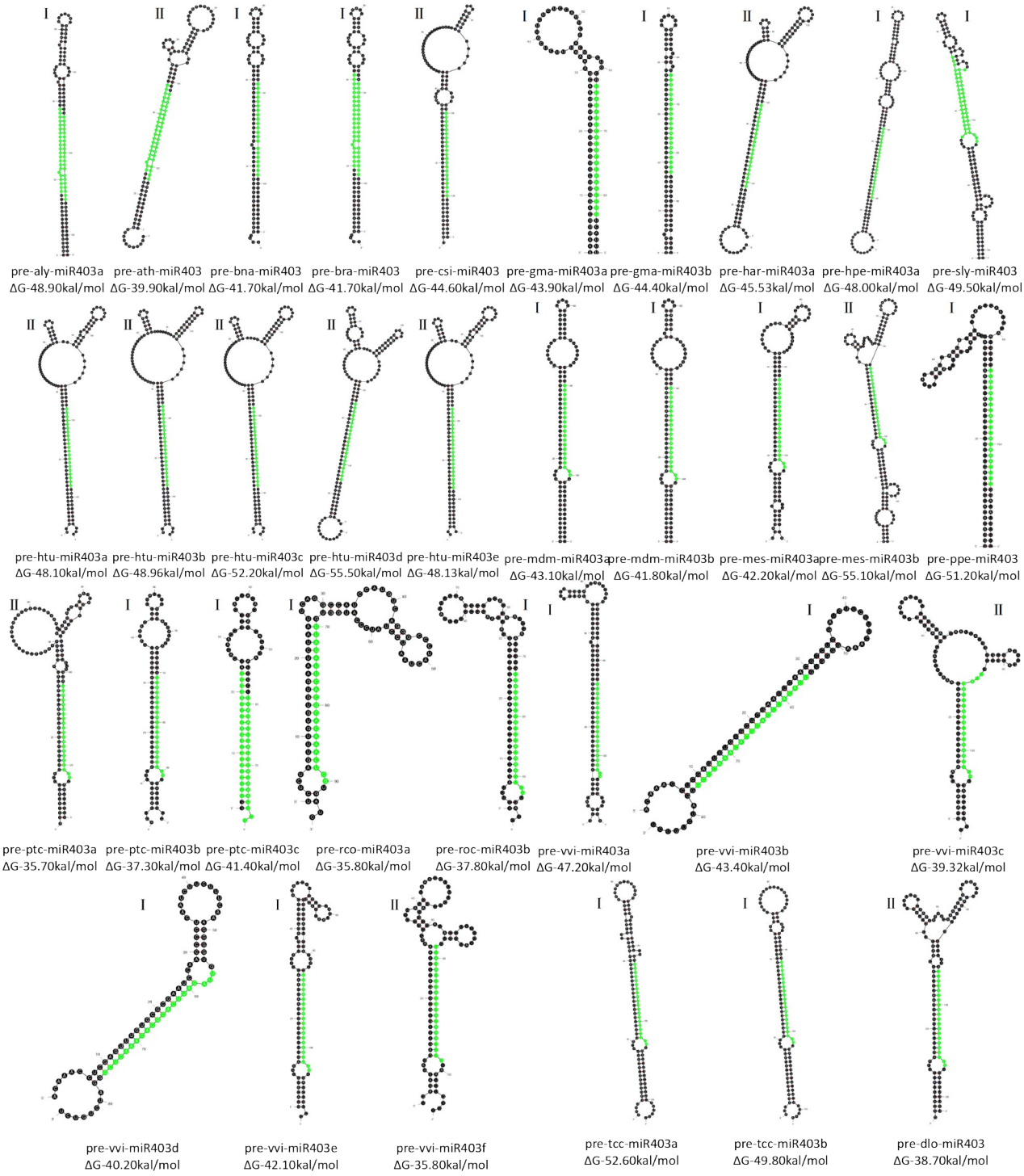
植物pre-miR403的序列，其长度分布在79~156 nt。通过Mfold对植物pre-miR403序列进行二级结构分析，pre-miR403序列均能形成稳定的发卡结构（图1）。参照Zhao等[25]的方法对其分类，其中环状结构有21条属于Ⅰ类型，13条属于Ⅱ类型（图1），其序列最小折叠自由能为−35.70~−55.50 kal·mol^{-1}，而龙眼pre-miR403属于Ⅱ类型且最小折叠自由能为−38.70 kal·mol^{-1}，提示龙眼pre-miR403存在的合

表2　植物miR403家族成员分布与数量

Table 2　Distribution and quantity of plant miR403 family members

分类 Type		简写 Abbreviation	前体个数 Number of pre-miRNA	成熟体个数 Number of mature miRNA
科 Family	物种 Species			
十字花科 Brassicaceae	琴叶拟南芥 *Arabidopsis lyrata*	*aly*	2	4
	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	*ath*	1	2
	油菜 *Brassica napus*	*bna*	1	1
	芜菁 *Brassica rapa*	*bra*	1	2
芸香科 Rutaceae	脐橙 *Citrus sinensis*	*csi*	1	1
豆科 Fabaceae	大豆 *Glycine max*	*gma*	2	2
菊科 Asteraceae	绢毛葵 *Helianthus argophyllus*	*har*	1	1
	草原向日葵 *Helianthus petiolaris*	*hpe*	1	1
	菊芋 *Helianthus tuberosus*	*htu*	5	5
蔷薇科 Rosaceae	苹果 *Malus domestica*	*mdm*	2	2
	桃 *Prunus persica*	*ppe*	1	1
大戟科 Euphorbiaceae	木薯 *Manihot esculenta*	*mes*	2	2
	蓖麻 *Ricinus communis*	*rco*	2	2
杨柳科 Salicaceae	毛果杨 *Populus trichocarpa*	*ptc*	4	5
茄科 Solanaceae	番茄 *Solanum lycopersicu*	*sly*	1	2
梧桐科 Sterculiaceae	可可 *Theobroma cacao*	*tcc*	2	2
葡萄科 Vitaceae	葡萄 *Vitis vinifera*	*vvi*	6	6
无患子科 Sapindaceae	龙眼 *Dimocarpus longan*	*dlo*	1	1

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



绿色为成熟体生成位置；aly-pre-miR403a 和 aly-pre-miR403b 序列相同，ptc-pre-miR403a 和 ptc-pre-miR403d 序列相同，仅取其中一个进行分析。

The green region is mature miR403. Aly-pre-miR403a and aly-pre-miR403b possess the same sequence，ptc-pre-miR403a and ptc-pre-miR403d possess the same sequence. Therefore，only one of them is listed on above picture.

图 1 植物 miR403 家族前体二级茎环结构分析

Fig. 1 Analysis of secondary stem-loop structure of plant miR403 family precursors

理性。

根据 miR403 生成位置与长度分析发现，植物 miR403 家族共有 42 条 miR403，36 条来自于 pre-miR403 的 3 臂，长度以 21 nt 为主，6 条产生于 pre-miR403 的 5 臂，除 ptc-miR403c-5P 之外，长度均为 22 nt（图 2）；而龙眼 miR403 为 21 nt，来自于龙眼 pre-

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

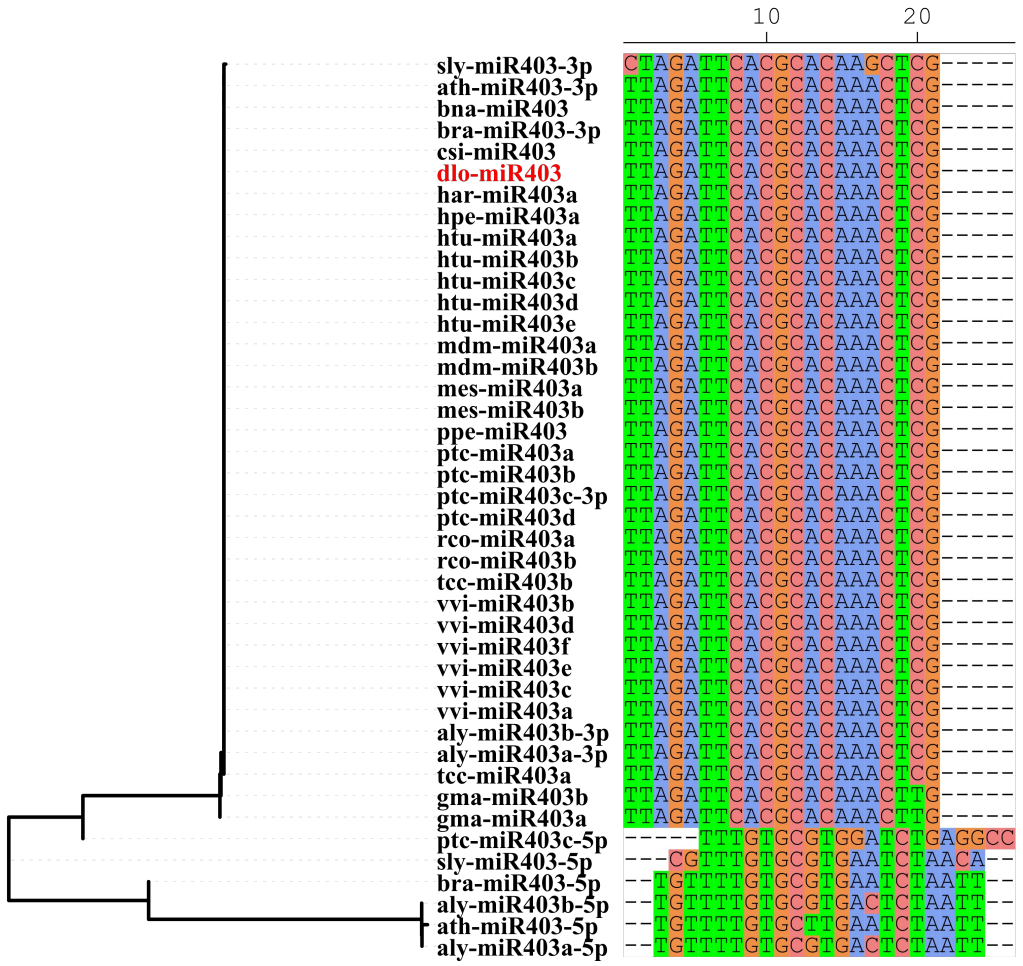


图 2　成熟体进化树及序列多重比较

Fig. 2　Evolutionary tree of miR403 and multiple sequences comparison

miR403的3臂，可见miR403在大多数植物中具有较高的保守性。而不同植物中miR403的数量各异，葡萄最多，有6个成员；菊芋和毛果杨次之，有5个成员，但大部分植物仅有1个或2个成员（表2）。

2.2　龙眼及其他植物miR403的进化关系分析

为了解龙眼miR403与其他植物的进化关系，通过MEGA7.0和iTOL构建了龙眼及其他17种植物miR403和pre-miR403的系统发育树。miR403系统发育树被分为两大主枝，第一枝为sly-miR403-5p、aly-miR403a-5p、aly-miR403b-5p、ath-miR403-5p和bra-miR403-5p组成，其余的37个miR403成员组成第二主枝（图2）。根据序列多重比较可见，3臂生成的成熟体序列高度保守保守，仅3个成员具有差异（gma-miR403a、gma-miR403b、sly-miR403-3p）（图2）。而5臂上生成的miR403，仅存在于拟南芥、琴叶拟南芥、毛果杨、芜菁和番茄中，且ptc-miR403c-5p来源于其前体的5臂却与其他物种生成与3臂的miR403聚类为一簇，推测ptc-miR403c-5p进化速度较慢、进化时间短。另外5个生成于5臂的miR403成员中，sly-miR403-5p不仅在序列上同其他几个成员差异较大，且其长度也比其他成员短。表明这种差异可能与物种特异性进化有关。

pre-miR403序列进化树主要分为三大主枝，第一主枝为pre-rco-miR403a、pre-vvi-miR403e、pre-vvi-miR403c和pre-vvi-miR403a构成；第二主枝由vvi-pre-miR403f、pre-bra-miR403、pre-bna-miR403等16个成员聚类而成；剩余16个成员构成第三主枝（图3）。miR403成熟体进化树中，miR403成员无论来源于其前体的3臂还是5臂，均以物种或科属相互聚类（图2）。而pre-miR403序列具有更大的分歧，并且存在物种间的离散。例如第一主枝中的4个pre-miR403成员共享同一个祖先，而pre-rco-miR403a与pre-rco-miR403b，pre-vvi-miR403的6个成员却离散于不同的进化主枝中。同样的现象还在木薯（mes）、可可（tcc）和毛果杨（ptc）中出现（图3）。然而，其生成的miR403高度保守，说明这些植

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

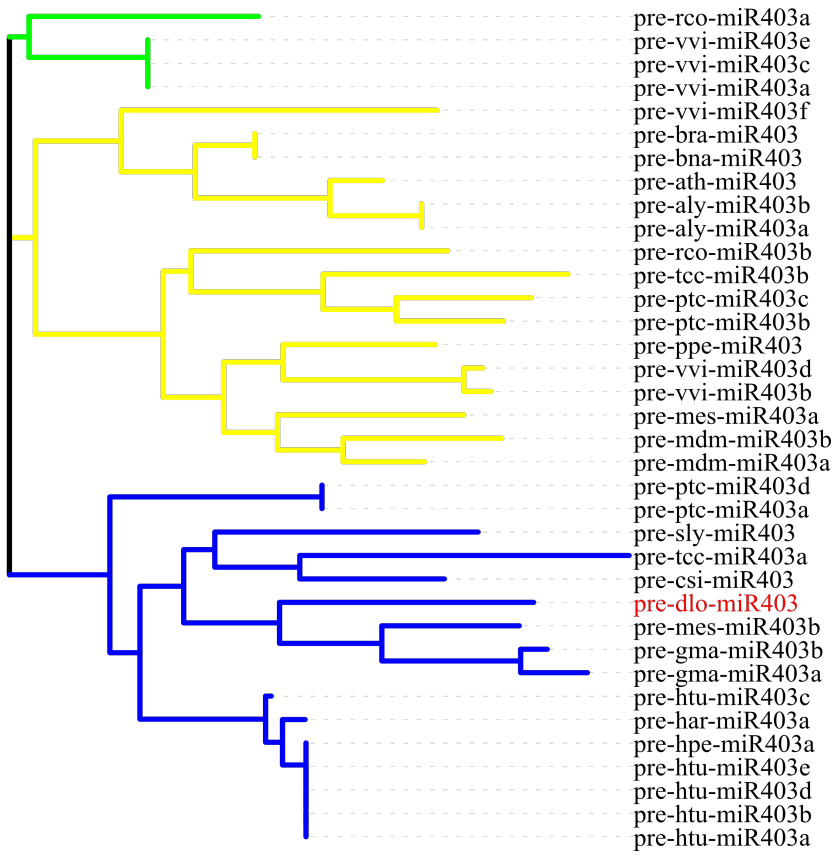


图 3 miR403 前体序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of plant pre-miR403s

物中 pre-miR403 成员来源不同，但其功能一致。pre-miR403 序列保守性分析表明，pre-miR403 在 3 臂和 5 臂的功能区域保守性较强，且 3 臂的保守性强于 5 臂（图 4）与 miR403 序列多重结果一致（图 2）。奇怪的是 5 臂生成的成熟体比例仅为 6/41（图 2），推测在一些物种中生成于 3 臂的 miR403 可替代 5 臂的

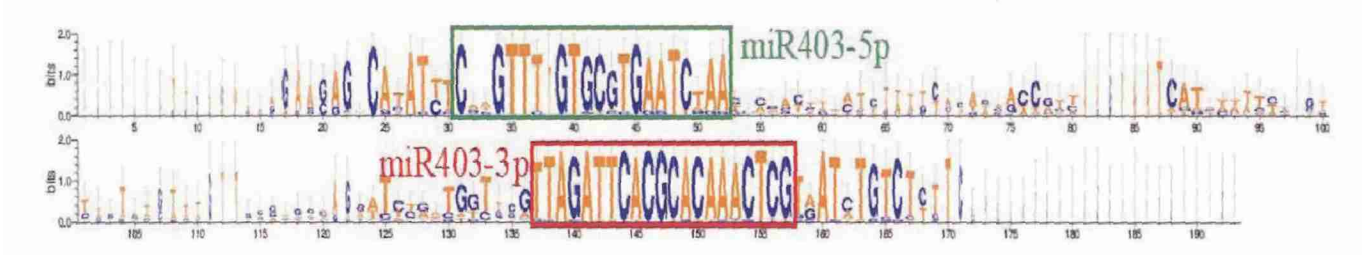


图 4 植物 36 个 pre-miR403 保守序列分析

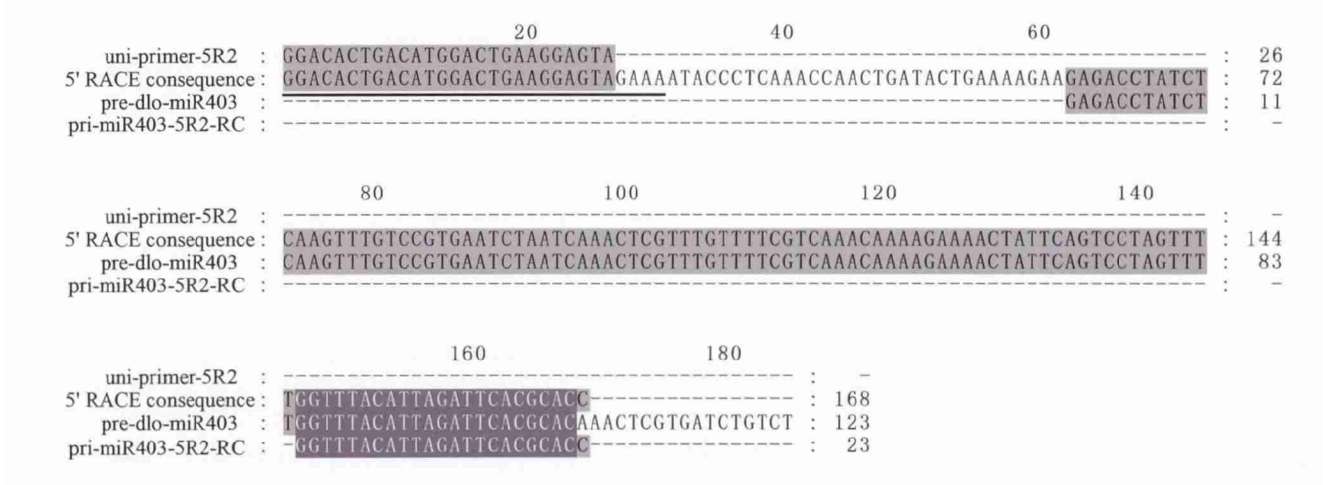
Fig. 4 Analysis the conservation sequences of 36 plant pre-miR403s

miR403 的作用导致 miRNA 的丢失。而 pre-dlo-miR403 和 dlo-miR403 与大部分植物进化过程相一致，体现龙眼 miR403 进化的保守性。

2.3 龙眼 pri-miR403 5’末端 cDNA 序列克隆

基于得到的龙眼 pre-miR403 序列 123 bp，设计 RACE 引物，以 GeneRacerTM Kit 试剂盒合成的 cDNA 为模板，通过 RLM-RACE 法扩增得到一条长度约为 150 bp 的片段。测序结果显示该片段大小为 168 bp。另外，在该序列上包含了完整的 GeneRacerTM Kit 试剂盒所添加的寡核苷酸序列和 Pri-miR403-5R2 引物（图 5），表示该序列已经到达 pre-miR403 5’末端，所添加的寡核苷酸序列后的 A 为 TSS。将 pre-miR403 与 5’RACE 序列拼接得到长度为 154 bp 的包含 5’末端序列的 pre-miR403 cDNA。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



划黑线部分为 GeneRacerTM Kit 试剂盒添加的序列。

The sequence with black line is added by GeneRacerTM Kit.

图 5　龙眼 miR403 cDNA5’末端序列克隆

Fig. 5 Cloning of longan miR403 cDNA 5’ end

2.4　龙眼及其他等5种植物*MIR403*转录起始位点鉴定及启动子功能分析

根据上述得到的龙眼*MIR403*的TSS，往其上游提取2 800 bp为其启动子序列，并在NCBI中根据已登陆的拟南芥pri- miR403序列（登录号：EU549687.1），向前提取2 800 bp作为启动子。另外，通过柑橘、大豆和葡萄基因组数据库定位pre-miR403的基因座并采用BDGP和TSSP软件进行转录起始位点预测（表3）。结果显示，gma-miR403a、csi-miR403、vvi-miR403a/b/c/d/e均在BDGP中预测得到了可信的较高的TSS；除csi-miR403外，其余miR403成员的TTS均在其前体上游350 bp以内。而gma-miR403b和vvi-miR403f由于BDGP预测结果可信度较低，进一步通过TSSP预测其TSS，结果显示，其TSS在均其前体上游350 bp以内。分别从柑橘、大豆和葡萄基因组中提取得到各*MIR403*启动子序列2 800 bp。采用PlantCARE在线网站分析启动子顺式作用元件（图6）。

上述5种植物的9个*MIR403*启动子中含有大量保守元件（TATA-box，CAAT-box）。此外，*MIR403*启动子序列还含有大量的光应答元件，包括35类共250个光响答元件。不同物种之间所含有的光响应元件数量和种类也有区别，csi-*MIR403*启动子中最多，vvi-*MIR403a*启动子中最少，分别为40个和14个。同时，在这些启动子中还有大量功能相同但序列不同的顺式作用原件。表明植物*MIR403*启动子具有一定特异性，但功能保守。

其次，在不同*MIR403*启动子中预测到ABA（Abscisic acid）、SA（Salicylic acid）、GA（Gibberellin）、MeJA（Methyl Jasmonate）、Auxin和Ethylene的顺式作用元件。其中，csi-*MIR403*和vvi-*MIR403a*具有全部6种激素的响应元件，其余的成员都缺少1~2种激素响应元件。另外，在大豆中，其*MIR403*之间启动子激素响应元件可以互补，从而可以响应所有激素。但龙眼和拟南芥仅有一个*MIR403*，猜测还有其他途径响应缺失的激素或对该激素不敏感。此外，*MIR403*启动子序列还含有各类调节逆境胁迫的元件。其中主要有响应高温胁迫的元件HSE，干旱诱导的元件MBS，厌氧调控的元件ARE，应答胁迫和防御的TC-rich repeats以及关于低温胁迫的元件LTR。提示miR403可能参与抵抗逆境胁迫。

最后，*MIR403*启动子中还存在许多与植物生长发育相关的元件，不同植物中都含有不同数量的胚乳调控元件（Skn-1_motif，GCN4_motif），参与类黄酮合成的调控的响应元件MBSI/II、玉米胶蛋白代谢相关的元件O2-site、植物昼夜周期调控的元件circadian、真菌诱导响应元件Box-W1和分生组织表达调控相关的元件CAT-box/CCGTCC-box。

2.5　龙眼体胚发生早期的miR403及pre-miR403表达模式分析

为了解miR403及pre-miR403在龙眼体胚早期发生过程中的表达模式，本试验在液体MS中将龙

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

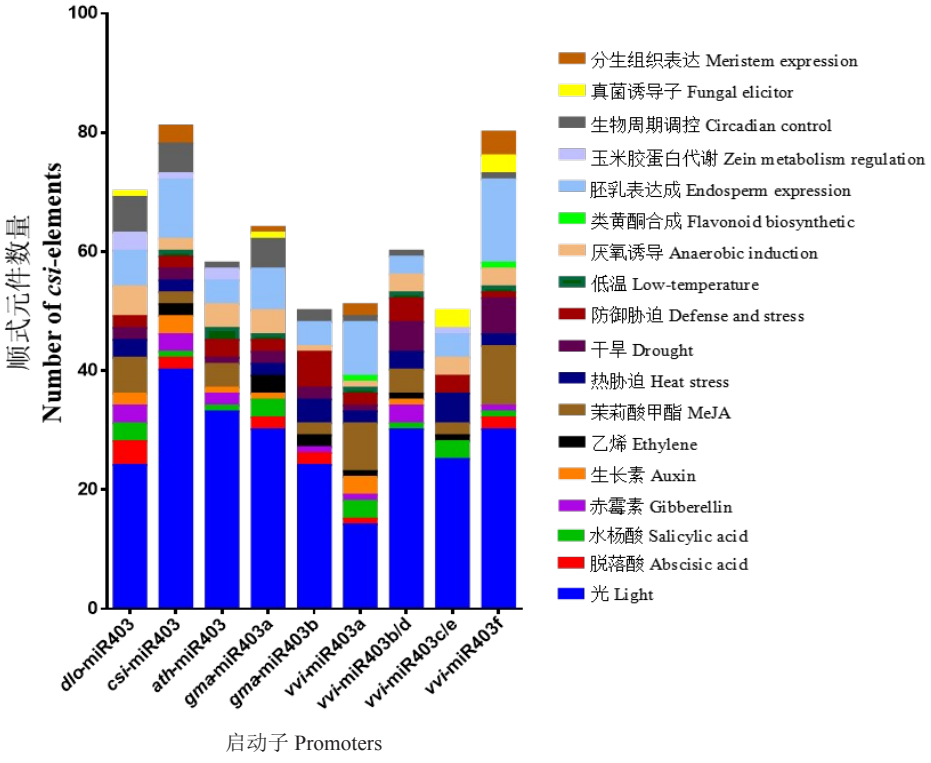
表 3 植物 *MIR403* 转录起始位点预测

Table 3 Transcriptional starting site (TSS) prediction of *MIR403* in plants

启动子 Promoters	转录起始区 Transcriptional starting region 开始 Start	结束 End	得分 Score	转录起始区和转录起始位点序列 The sequences of transcriptional starting region and transcriptional starting site
gma-miR403a	-317	-267	1	TCACATTTTATATATATTAGGGGAAGAGAGGCACGGAGTG**T**CTCTCTAAA
csi-miR403	-783	-733	0.99	TGAAAATTTATATATATAGGTTGACAGATTGGGTTAAAAAA**T**TTTAACCC
vvi-miR403a	-91	-41	0.97	ATTGTCCGTATTTATATCAGCCATCTATAAATGGAAGTCG**A**GTCCCAAAG
	-76	-26	0.97	ATCAGCCATCTATAAATGGAAGTCGAGTCCCAAAGTCTTA**A**CACCCAAAA
vvi-miR403b/d	-80	-30	0.98	ACTGTTTTTTTATATAAAGTGAAGCAAAGGCATTTGGCTC**T**TCAGTATAA
vvi-miR403c/e	-163	-113	0.98	ATTAATTGACCAAAAAAGCCCTCTCAAACGCGTTCAGCCC**A**AAGCATCAT
	-75	-25	0.98	ATCAGCCATCTATAAATGGAAGTCGAGCCCCAAAGCCCAAC**A**CCCAAAAC
gma-miR403b（TSSP）	-260	-210	/	TTTCAAATTATTATTATACATATACTAGTTCATGTTGCTGTA**T**AAAATACT
vvi-miR403f（TSSP）	-309	-359	/	ATAATTTGAGATATTCCATCGATATAACCAAATATTTCTTA**G**AAAAATGC

注：加粗碱基为转录起始位点。

Note：The overstriking base is transcriptional starting site.



上述仅列出部分光、激素、胁迫以及生物学功能的元件。

There are only listed some the elements related with light，hormones，stress and biological functions.

图 6 植物 *MIR403* 启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of plant *MIR403* promotes

眼 EC 诱导为 GE，采用 qPCR 鉴定 miR403 和 pre-miR403 的表达模式。在龙眼体胚早期发生过程中，miR403 整体呈现为显著下调趋势，但其在 3~9 d 表达量轻微上调。而 pre-miR403 在龙眼体胚在早期发生过程中显著下调，仅在 12 d 时表达量略有回升，其整体趋势同 miR403 一致（图 7），提示 miR403 和 pre-miR403 下调表达有利于促进龙眼球形胚的形态建成。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

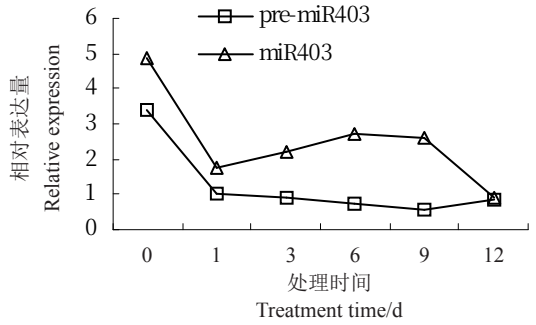


图7　龙眼早期体胚发生早期中 miR403 和 pre-miR403 的定量分析

Fig. 7 Expression patterns of miR403 and pre-miR403 during longan early SE

3　讨　论

3.1　植物 miR403 家族进化保守性与特异性分析

进化分析作为研究miRNA以及基因常用的方法之一已被广泛应用。miR403进行进化分析显示，miR403存在于包括龙眼在内的18双子叶植物中，是双子叶植物特有的miRNA家族[12-13]。双子叶植物作为高等植物出现在距今100万年前[26-27]，表明miR403属于新兴的miRNA，进化时间较短。根据miRNA生成的原理[15]，miR403成员绝大部分来源于其前体的3臂，而pre-miR403两臂均具有高度保守的区域，推测miR403与miR156类似[28]在物种内部存在miRNA丢失的现象。另外，生成于5臂的miR403成员与生成于3臂的miR403成员聚类，说明植物miR403具有趋向保守的进化方式。

另外，所有*MIR403*启动子中均存在大量的光元素响应元件、激素响应原件、胁迫响应元件和生长相关的顺式作用元件。而有报道表明，在热和盐处理后的胡萝卜转录组中发现miR403高度表达[29-30]；而Khaksefidi等[18]进一步的证实了在向日葵中miR403可以参与到干旱、热、盐和镉胁迫途径中；Zhang等[17]的研究也表明miR403对于ABA胁迫以及光照的响应。综上所述，miR403广泛的参与到植物的胁迫响应和生长发育中，且在不同植物中顺式作用元件功能相近，进化上具有一定的保守性。

3.2　龙眼 miR403 参与龙眼体胚发生早期形态建成

Lin等[11]在龙眼体胚中检测到了miR403，暗示miR403在龙眼体胚中可能具有相应的生物学功能。先前关于miR403的研究主要集中于miR403联合*AGO2*对病毒的防御[14-16]，而对于miR403在植物生长发育的生物学功能仅在番茄中得到过验证[17]。在龙眼体胚早期发生过程中，pre-miR403作为miR403的转录前体，两者均在此过程中显著下调表达，提示miR403和pre-miR403的下调表达可能有利于促进龙眼球形胚形态建成。另外，上述分析显示，miR403可响应大量的激素和胁迫信号的转导[17-18,29-30]，而植物体胚发生是一个复杂的过程，在龙眼体胚发生过程中，外源2,4-D作为调控龙眼体胚发生的关键因素，其主要的作用则是抑制内源IAA的表达[29,30-32]。在无外源2,4-D条件下的龙眼体胚发生过程中，从EC到GE之间，EC之后的各个阶段的内源IAA均极显著的高于EC阶段[33]。而龙眼miR403启动子含有生长素类的响应元件，提示miR403可能响应内源IAA而参与到龙眼早期体胚发生过程中。而龙眼体胚发生过程中内源GA_3、ABA等激素也同样有变化，因而也同样可能对于miR403基因的转录产生一定的影响。龙眼胚胎发育作为调控龙眼果实品质的主要因素之一，对于miR403的深入研究，可能对龙眼果实品质改良具有相应的借鉴。

参考文献 References:

[1] 罗军，周灿芳，付丹文，万忠，潘学文，何淑群. 2011年广东龙眼产业发展现状分析[J]. 广东农业科学，2012，39(5)：6-8.
LUO Jun，ZHOU Canfang，FU Danwen，WAN Zhong，PAN Xuewen，HE Shuqun. Analysis on the development status of longan industry in Guangdong province in 2011[J]. Guangdong Agricultural Science，2012，39(5)：6-8.

[2] ARMENTA-MEDINA A，LEPE-SOLTERO D，XIANG D，DATLA R，ABREU-GOODGER C，GILLMOR C S. *Arabidopsis thaliana* miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote[J]. Developmental Biology，2017，431(2): 145-151.

[3] LIN Y，LAI Z，TIAN Q，LIN L，LAI R，YANG M，ZHANG D，CHEN Y，ZHANG Z. Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of *ARF10*，-*16*，and-*17* cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Frontiers in Plant Science，2015，6:956.

[4] LIN Y，LAI Z，LIN L，LAI R，TIAN Q，YE W，ZHANG D，YANG M，CHEN Y，ZHANG Z. Endogenous target mimics，microRNA167，and its targets *ARF6*，and *ARF*8，during somatic embryo development in *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Molecular Breeding，2015，35(12): 227.

[5] LIN Y，LIN L，LAI R，LIU W，CHEN Y，ZHANG Z，XU X，LAI Z. MicroRNA390-directed *TAS3* cleavage leads to the production of tasiRNA-*ARF3*/*4* during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Frontiers in Plant Science，2015，6(127):1119.

[6] LI W，ZHANG S，HAN S，WU T，ZHANG J，QI L. Regulation of *LaMYB33* by miR159 during maintenance of embryogenic potential and somatic embryo maturation in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture，2013，113(1): 131-136.

[7] 苏立遥，张帅，陈旭，徐小萍，赖钟雄，林玉玲. miR171家族成员分子特性及miR171b调控靶标在龙眼体胚发生早期的表

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

达分析[J]. 果树学报，2018，35(11)：1324-1334.
SU Liyao，ZHANG Shuai，CHEN Xu，XU Xiaoping，LAI Zhongxiong，LIN Yuling. Molecular characteristics of miR171 family members and analysis of the expression pattern of miR171b regulatory targets during early somatic embryogenesis in longan[J]. Journal of Fruit Science，2018，35(11)：1324-1334.

[8] LI H，ZHANG J，YANG Y，JIA N，WANG C，SUN H. MiR171 and its target gene *SCL6*，contribute to embryogenic callus induction and torpedo-shaped embryo formation during somatic embryogenesis in two lily species[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture，2017，130(3):591-600.

[9] SZYRAJEW K，BIELEWICZ D，DOLATA J，WÓJCIK A M，NOWAK K，SZCZYGIEŁ-SOMMER A，SZWEYKOWSKA-KULINSKA Z，JARMOLOWSKI A，GAJ M D. MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science，2017，8:18.

[10] LIU Y，HAN S，DING X，LI M，ZHANG L，LI W，XU H，LI Z，QI L. Transcriptome analysis of mRNA and miRNA in somatic embryos of *Larix leptolepis* subjected to hydrogen treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences，2016，17(11): 1951.

[11] LIN Y，LAI Z. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.)[J]. Plos One，2013，8(4): e60337.

[12] SUNKAR R，JAGADEESWARAN G. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species [J]. Bmc Plant Biology，2008，8(1): 37.

[13] JAGTAP S，SHIVAPRASAD P V. Diversity，expression and mRNA targeting abilities of Argonaute-targeting miRNAs among selected vascular plants[J]. BMC Genomics，2014，15 (1): 1049.

[14] BAO D，GANBAATAR O，CUI X，YU R，BAO W，FALK B W，WURIYANGHAN H. Down-regulation of genes coding for core RNAi components and disease resistance proteins via corresponding microRNAs might be correlated with successful *Soybean mosaic virus* infection in soybean[J]. Molecular Plant Pathology，2018，19(4): 948-960.

[15] ALLEN E，XIE Z，GUSTAFSON A M，SUNG GH，SPATAFORA J W ，CARRINGTON J C. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Genetics，2004，36(12): 1282-1290.

[16] LOBBES D，RALLAPALLI G，SCHMIDT D D，MARTIN C，CLARKE J. Serrate: a new player on the plant microRNA scene [J]. Embo Reports，2006，7(10): 1052-1058.

[17] ZHANG C，XIAN Z，HUANG W，LI Z. Evidence for the biological function of miR403 in tomato development[J]. Scientia Horticulturae，2015，197: 619-626.

[18] KHAKSEFIDI R E，MIRLOHI S，KHALAJI F，FAKHARI Z，SHIRAN B，FALLAHI H，RAFIEI F，BUDAK H，EBRAHIMIE E. Differential expression of seven conserved microRNAs in response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*[J]. Frontiers in Plant Science，2015，6:741.

[19] PUZEY J R，KARGER A，AXTELL M，KRAMER E M. Deep annotation of Populus trichocarpa microRNAs from diverse tissue sets[J]. Plos One，2012，7(3): e33034.

[20] XU Q，LIU Y，ZHU A，WU X，YE J，YU K，GUO W，DENG X. Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type[J]. Bmc Genomics，2010，11(1): 246.

[21] MICA E，PICCOLO V，DELLEDONNE M，FERRARINI A，PEZZOTTI D，CASATI C，FABBRO C D，VALLE G，POLICRITI A，MORGANTE M，PESOLE G，PÈ M E，HORNER D S. Erratum to: High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*[J]. Bmc Genomics，2010，11(1): 109.

[22] KULCHESKI F R，OLIVEIRA L F D，MOLINA L G，ALMERÃO M P，RODRIGUES F A，MARCOLINO J，BARBOSA J F，STOLF-MOREIRA R，NEPOMUCENO A L，MARCELINO-GUIMARÃES F C，ABDELNOOR R V，NASCIMENTO L C，CARAZZOLLE M F，PEREIRA G A，MARGIS R. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses[J]. BMC Genomics，2011，12(1): 307.

[23] LIN Y，MIN J，LAI R，WU Z，CHEN Y，YU L，CHENG C，JIN Y，TIAN Q，LIU Q，LIU W，ZHANG C，LIN L，HU Y，ZHANG D，THU M，ZHANG Z，LIU S，ZHONG C，FANG X，WANG J，YANG H，VARSHNEY R K，YIN Y，LAI Z. Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics [J]. Gigascience，2017，6(5): 1-14.

[24] LIN Y，LAI Z. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. Plant Science，2010，178(4): 359-365.

[25] ZHAO X，CHEN S，ZHAO L，ZHANG X，MA P，GUO Z. Evolution of MIR166 Gene family in land plants[J]. Plant Diversity & Resources，2014，36(3): 331-341.

[26] CLARKE J T，WARNOCK R C M，DONOGHUE P C J. Establishing a time-scale for plant evolution[J]. New Phytologist，2011，192(1): 266-301.

[27] SMITH S A，BEAULIEU J M，DONOGHUE M J. An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2010，107(13): 5897-5902.

[28] MOREA E G O，SILVA E M D，SILVA G F F E，VALENTE G T，ROJAS C H B，VINCENTZ M，NOGUEIRA F T S. Erratum to: Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants[J]. Bmc Plant Biology，2016，16(1): 1.

[29] WANG R，XU L，ZHU X，ZHAI L，WANG Y，YU R，GONG Y，LIMERA C，LIU L. Transcriptome-wide characterization of novel and heat-stress-responsive microRNAs in Radish (*Raphanus Sativus* L.) using next-generation sequencing[J]. Plant Molecular Biology Reporter，2014，33(4): 867-880.

[30] SUN X，XU L，WANG Y，YU R，ZHU X，LUO X，GONG Y，WANG R，LIMERA C，ZHANG K. Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. BMC Genomics，2015，16(1): 1-16.

[31] 陈春玲 . 龙眼体细胞胚胎发生机理的初步研究[D]. 福州：福建农林大学，2001.
CHEN Chunling. A preliminary study on mechanism of somatic embryogenesis in longan [D]. Fuzhou:Fujian Agriculture and Forestry University，2001.

[32] 方智振，赖钟雄 . 龙眼体胚发生中期发育同步化的初步调控[J]. 中国农学通报，2009，25(1): 152-155.
FANG Zhizhen，LAI Zhongxiong. Preliminary synchronization regulation at the middle developmental stage during longan somatic embryogenesis[J].Chinese Agricultural Science Bulletin. 2009，25(1)：152-155.

[33] 赖钟雄，陈春玲 . 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化[J]. 热带作物学报，2002，23(2): 41-47.
LAI Zhongxiong，CHEN Chunling. Endogenous hormones changes during longan somatic embryogenesis[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，2002，23(2)：41-47.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net