

山核桃 *miR159* 家族成员进化特性分析及功能研究

张博, 杨正福, Kean-Jin Lim, 舒李露, 李财运, 王正加*

(浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300)

摘要:【目的】了解山核桃 *miR159* 家族成员的进化特性以及在植物花发育过程中的作用。【方法】通过 PsRNATarget 软件预测 *cca-miR159* 的靶基因, 利用生物信息学软件对其进行系统进化及 *miR159* 成熟体碱基保守性分析; 采用 5' RACE 技术验证 *cca-miR159* 对靶基因的裂解作用; 以山核桃的雌雄花芽为试验材料, 利用 PCR 技术扩增 *cca-miR159* 前体序列, 通过转基因技术得到转基因阳性植株并对其基因功能进行验证, 并通过荧光定量 PCR 分析转基因植株中 *miR159* 靶基因的表达情况。【结果】在山核桃中成功克隆了 *miR159* 的 2 种前体序列, 分别为 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2*。其中 *cca-miR159.1* 前体序列中只含有 1 个 *cca-miR159a* 成熟体, 而 *cca-miR159.2* 前体序列中含有 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 2 个成熟体, 且 *cca-miR159a* 碱基保守性明显高于 *cca-miR159b*。进化分析发现山核桃 *miR159* 前体序列与杨树的亲缘关系较近。预测到 *cca-miR159a* 的靶基因主要为 MYB 家族基因, 而 *cca-miR159b* 的靶基因则为 *API* 和 *UBX*, 分别对花发育以及生长素的调节有影响。进而对靶基因的切割位点进行验证, 发现 *cca-miR159* 的靶基因切割位点基本在第 11 和 12 位碱基之间。过表达 *cca-miR159.1* 的拟南芥阳性植株叶片数量少于野生型, 而过表达 *cca-miR159.2* 的阳性植株, 除了叶片数量减少, 其花期较野生型提早 10 d 左右。【结论】山核桃 *miR159* 含有 *cca-miR159a/b* 2 个成熟体, 它们主要在靶基因的第 11 与 12 位碱基之间进行剪切。*cca-miR159a* 的靶基因主要为 MYB 家族基因, 其中 *MYB33*、*MYB65* 促进花药与花粉发育。*cca-miR159* 抑制靶基因的表达从而发挥作用, *cca-miR159.1* 过表达对植株的生长有一定的抑制作用, *cca-miR159.2* 具有促进植物花期提前作用。

关键词: 山核桃; *cca-miR159*; 靶基因; 花发育; 转基因

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)06-0884-11

Evolutionary characteristic and functional research of *miR159* gene family in hickory

ZHANG Bo, YANG Zhengfu, LIM Kean-Jin, SHU Lili, LI Caiyun, WANG Zhengjia*

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: 【Objective】 *MiR159* is a conserved gene family, which plays an important role in vegetative and reproductive growth in plants, especially in the development of plant floral organs. In the *miR159* gene family, there are usually multiple members, which regulate plant growth and development by acting on their target genes. There has been no any report on the research of *miR159* gene family in hickory so far. Therefore, we conducted a research on *miR159* family in hickory. The aim of the study was to reveal the secondary structure of its precursor sequence and analyze its stem-loop structure, in order to explore the phylogenetic relationship of *miR159* and the conservation of *miR159* mature bases and to verify the cleavage site of *miR159* on the target gene and master its cleavage base position. It is necessary to explore the function of *miR159* in hickory, and the role of *miR159* in plant development through genetic modification to provide a theoretical basis for the study of the flowering mechanism of hickory.

【Methods】 The precursor sequence of *miR159* was obtained from the previously identified *miR159* fami-

收稿日期: 2020-12-24 接受日期: 2021-03-22

基金项目: 浙江省科技厅重大研发专项(2018C02004); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02052-13); 国家自然科学基金(32001335)

作者简介: 张博, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。Tel: 15990196950, E-mail: zhangboasd@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0571-63743856, E-mail: wzhj21@163.com

ly members of hickory. The RNA Folding from online website was used to analyze the secondary structure of the precursor sequence. The precursor sequences of *Arabidopsis*, rice, soybean, poplar, and grape in miRBase were downloaded to perform multiple alignments of miRNA genes. Then the bootstrap is set to 1000 times using the neighbor joining method, and the evolutionary tree of *miR159* precursor sequence was constructed using MEGA 5.0. The conservation of hickory *miR159* sequence was analyzed through the online platform WebLOGO, and the target gene of the *cca-miR159* was predicted by PsRNATarget software. While the cleavage effect of the *cca-miR159* on target genes was verified using 5' RACE technology with the male and female flower buds of hickory as test materials. The *cca-miR159* precursor sequence was amplified with PCR, and positive transgenic plants were obtained by transgenic technology to verify their gene function. 【Results】In this study, two precursor sequences of the *miR159*, *cca-miR159.1* and *cca-miR159.2*, were cloned in hickory. The *cca-miR159.1* precursor sequence contained only one *cca-miR159a* mature body, the *cca-miR159.2* precursor sequence contained two mature bodies, *cca-miR159a* and *cca-miR159b*. The bases conservation of *cca-miR159a* were obviously higher than later, the base changes of the *cca-miR159b* at positions 4, 8, 9, 11, 12, 13, and 20 were quite different. Evolutionary analysis found that hickory, poplars and grapes were clustered in the same subfamily, indicating that the *cca-miR159* was more closely related to the *Ptc-miR159*. At the same time, it was found that the two precursor sequences of the *cca-miR159* were clustered on the same branch, and there might have been a duplication event during the evolution process, and the phenomenon of gene doubling occurred. It was predicted that the target genes of the *cca-miR159a* were mainly *MYB* family genes. The *MYB* proteins plays an important role in regulating the cell cycle. *MYB* proteins mainly control the cell cycle by controlling the different periods of cell division, while the target genes of the *cca-miR159b* are *API* and *UBX*, and contig780 corresponds to the *API*, which plays an important role in the formation of plant flower meristems and floral organs. The expression of the *API* promotes plant flowering. Contig00675 corresponds to the *UBX* protein, which regulates the formation of growth hormone. The cleavage site of the target gene of hickory *miR159* was verified and the cleavage site of the target gene of the *cca-miR159* was basically between the 11th and 12th base, and its cleavage site was different in different species. Through genetic modification, it was found that the number of leaves of *Arabidopsis thaliana* positive plants overexpressing *cca-miR159.1* was less than that of the wild type, while the number of leaves of positive plants overexpressing *cca-miR159.2* was reduced by about 10 days earlier than that of the wild type. 【Conclusion】*miR159* contained two mature forms of the *cca-miR159a/b* in hickory, and the two members were mainly cleaved between the 11th and 12th base of the target gene. The target genes of the *cca-miR159a* were mainly *MYB* family genes, among them *MYB33* and *MYB65* would promote the development of anthers and pollen. The *cca-miR159a* might inhibit the growth of plant leaves, but the *cca-miR159b* would advance the flowering period of the plant. Based on the above experiments, the next step could be to explore mechanism of miRNA and target genes regulate plant growth and development through the relationship between *miR159* and target genes.

Key words: Hickory; *cca-miR159*; Target gene; Flower development; Transgenic

山核桃(*Carya cathayensis*)属于胡桃科山核桃属,是我国重要的经济干果和木本油料树种,也是山区农民脱贫致富的重要经济来源树种^[1]。山核桃从种子萌发到生长结果需要10 a(年)左右时间,雌雄同株异花,发育时期和进程各不相同,严重制约了产

业的发展。因此,通过控制山核桃成花转变相关基因的研究,可对童期短、早花、稳产高产的山核桃新品种选育提供重要的理论指导和基因资源。根据影响植物花发育的外源环境和内源因子,学者们提出了4条主要的开花调控途径:光周期途径、春化途

径、赤霉素(GA)途径、自主途径,这些调控途径形成了复杂的调控网络,从而精密地调控植物成花^[2-3],但随着对 miRNA 的深入研究,发现部分 miRNA 对植物的花器官发育也起到一定的调控作用。

MicroRNA(miRNA)是一类长度为20~24 nt的非编码小分子单链RNA,由具有茎环结构的pri-miRNA经Dicer酶剪切加工而成,通过碱基互补配对原则作用于靶mRNA,抑制mRNA的表达或使其降解,从而在转录后水平调控靶基因的表达^[4-5]。1993年, Lee等^[6]在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现了第一个miRNA,将其命名为*miRNA-lin4*。2002年,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中报道了miRNA,研究者通过分离克隆的方法从拟南芥的幼苗和花中发现了16种miRNA^[7],而后水稻(*Oryza sativa*)中也有报道^[8]。随着对miRNA的深入研究,已揭示了miRNA的作用机制,主要通过以下3种方式发挥作用:在转录后水平对靶mRNA的剪切降解、抑制靶基因mRNA的翻译^[5,9]、DNA甲基化^[10-11]。总之,miRNA通过以上3种作用方式,对植物的生长发育起着不同的作用,如对成花诱导^[12]、花器官形成^[13]、果实发育^[14]、种子形成,以及对各种生物与非生物胁迫响应的作用^[15-19]。

在拟南芥已知的miRNA,只有*miR156*、*miR159*、*miR172*这3个miRNA家族与花期调控有关。其中*miR159*通过调控MYB转录因子等靶标,在植物叶片形态建成、花器官发育中起着重要的作用。李晓燕^[20]发现*miR159*介导*GAMYB*转录因子表达可以调控大岩桐花期以及花器官发育。王梦琦等^[21]在葡萄中发现,*miR159*的靶基因*VvGAMYB*通过赤霉素开花途径参与葡萄的开花过程。陈旭等^[22]在果树龙眼中发现,*miR159*在生殖器官形成过程中具有重要的作用,尤其是在雄花中的作用显著。在库尔勒香梨中,马丽等^[23]发现*miR159*可能在萼片的脱落中起作用。包海等^[24]发现*miR159a*在杨树的低氮营养胁迫响应中可能发挥重要调控作用。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*家族成员的研究在上述的植物中都有报道,但山核桃*miR159*基因家族还未被研究。笔者课题组前期利用高通量测序技术对山核桃雌雄花芽样品构建的小分子RNA文库进行测序,筛选出开花相关的miRNA基因,发现了一些山核桃中未知

的miRNA家族,并预测到了包括*miR159*在内的新的家族基因,为后期*miR159*的研究提供了重要的参考数据^[25]。笔者以山核桃*miR159*的2条前体序列及2条成熟序列为基础,进行*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,以及表达特性的分析,同时在拟南芥中异源过表达这2个前体基因,对其功能进行验证,为进一步研究山核桃*miR159*基因功能和探究其在育种中的应用潜力提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 植物材料

雌、雄花芽采自浙江农林大学果木园中15年生、长势良好的临安山核桃植株,雌雄花芽的采样日期如表1所示,采集后立即放入液氮,随后保存于-80℃冰箱备用。使用的野生型和转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)均为哥伦比亚型(Col-0),种植在温度24℃,16h光照、8h黑暗,湿度80%的人工气候培养室。

表1 山核桃雌雄花样品采集时期
Table 1 Collection period of male and female flower of hickory

样品 Sample	采集时期 Collection period	
	休眠期 Dormant period	生长期 Growth period
雄花 Male flower	2018-05-16	2019-03-10
	2018-05-23	2019-03-19
	2018-05-28	2019-03-29
	2018-06-07	2019-04-05
	2018-06-12	2019-04-08
	2018-06-17	2019-04-18
	2018-06-23	
雌花 Female flower	2018-07-16	
		2019-03-21
		2019-03-25
		2019-03-29
		2019-04-05
	2019-04-08	
	2019-04-11	

1.2 山核桃*miR159*序列的获得及其二级结构

笔者课题组前期通过转录组测序构建了山核桃miRNA文库^[25],从中筛选鉴定出2个山核桃*miR159*成熟体,分别命名为*cca-miR159a*和*cca-miR159b*。将获得的山核桃*miR159*成熟体序列比对到山核桃数据库,并去除冗余,获得前体序列。得到的山核桃*miR159*前体序列通过RNA Folding Form(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)在线网站进行二级结构折叠。

1.3 山核桃 *miR159* 的系统进化分析

从 miRBase (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) 在线网站下载拟南芥、水稻、大豆 (*Glycine max*)、杨树 (*Populus trichocarpa*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 等物种的 *miR159* 基因前体及成熟序列。利用 MEGA 5.0 软件中的 Muscle 对 miRNA 基因进行多重比对, 参数设置为: Gap opening penalty 为 -2.9、Gap extension penalty 为 0、Hydropbicity Multiplier 为 1.2。比对结果使用 MEGA 5.0 的近邻相接法 (neighbor-joining) 构建 *miR159* 前体序列进化树, 重复值 bootstrap 设置为 1000 次。

1.4 山核桃 *miR159* 保守性分析及靶基因预测

通过在线平台 WebLOGO 对山核桃 *miR159* 序列的保守性进行分析。由于植物 miRNA 与其靶基因互补程度很高, 因此山核桃 *miR159* 基因家族的靶基因预测可以通过在线数据库 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 进行预测。其中,

比对的数据库为拟南芥数据库 (TAIR, Version 10), 以及载入本课题组测得的山核桃转录组数据, 参数设置为默认值。

1.5 RNA 的提取以及 cDNA 的合成

CTAB 法^[26]结合 minibest 通用 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa) 提取山核桃的雌雄花芽的 RNA。用 Nano-Drop 分光光度计 (Thermo Fisher) 检测 RNA 的浓度和纯度, 使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。利用 PrimeScript™ RT Reagent 试剂盒 (TaKaRa) 将总 RNA 反转录成 cDNA, 作为模板用于基因的扩增。

1.6 实时荧光定量 qPCR

使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司], 通过 qPCR 对基因的表达量进行分析。分别以拟南芥的 *actin* 和山核桃的 *5.8s* 作为内参基因 (表 2)。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq™ II 5 μL, cDNA 0.5 μL, 正向引物 0.4 μL, 反向引物 0.4 μL, 加灭菌后的双蒸水补足至 10 μL。

表 2 基因的 qPCR 引物

Table 2 The primer sequences of qPCR

基因名称 Gene name	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>actin</i>	GCCATCCAAGCTGTTCTC	GTCCTAGTCAACAGCAACAA
<i>5.8s</i>	CACCCAGCGTCGCGTCTCAT	CACCGTGGATCGTGGCAGTC
<i>MYB101</i>	CAATGCCACTGAGTAGGT	CTATTGGGTTGCTATCTT
<i>MYB33</i>	AAATCCTGCGACCAATCT	GGTATGTAACCTCCGTGCTT
<i>MYB65</i>	GGAAACCGGTCAAA	AATAGCCGCCAATAACTT
<i>MYB81</i>	CCAGTCATTACCCATCT	CTCACGCTCAGTTTTCATC
<i>MYB97</i>	CCAGTTGTAGCAGGGATA	CAAGCCAAGAGTTGAGAT

PCR 扩增反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 40 个循环, 每个样品进行 3 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

1.7 5'RACE 靶基因切割位点验证

使用 GeneRacer Kit (Invitrogen) 试剂盒, 对 *miR159* 的靶基因切割位点进行 RACE 扩增验证。第一轮 PCR 反应体系, 采用 touchdown PCR, 反应程序: 5 cycles: 94 °C、30 s, 72 °C、30 s; 5 cycles: 94 °C、30 s, 70 °C、30 s, 72 °C、30 s; 25 cycles: 94 °C、30 s, 68 °C、30 s, 72 °C、30 s。然后进行第二轮 PCR, 反应程序同第一轮 PCR。将第二轮 PCR 扩增产物连接到 PMD18 克隆载体 (TaKaRa) 上, 并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆并对其进行测序验证。靶基因切割位点验证所用引物如表 3 所示。

1.8 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 前体序列克隆以及过表达载体构建

使用 Primer5 软件对 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 前体序列进行引物设计, 得到 *cca-miR159.1* 的正向引物 5'-GGGGTACCTGATCCCA-CAGCCCTATCCATA-3', 反向引物 5'-GCTC-TAGACGTAAGGAGCAGAGCTAAAAGAG-3'; *cca-miR159.2* 的正向引物 5'-GGGGTACCCCTAG-GTTAATAATCAGTAACAATT-3', 反向引物 5'-GCTCTAGATCTGCCGAGTTATGGATTCCACA-3'。在设计引物序列中加入 *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶酶切位点 (划线部分), 由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。获得的片段连接至经双酶切的 pCAMBIA13011 表达载体中, 最终将通过表达载体转化到农杆菌 GV3101 中。

1.9 异源转化以及转基因阳性植株鉴定

通过农杆菌介导的转化技术侵染拟南芥的花

表 3 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 靶基因剪切位点引物
Table 3 *cca-miR159a*, *cca-miR159b* target genes splicing site primer

短链非编码RNA miRNA	靶基因名称 Target gene name	引物序列 Primer sequence	
<i>cca-miR159a</i>	<i>TCP2</i>	F:5'-GCCGGCTTTTCCTTTACCCTTCTGA-3' R:5'-CTACCGTCGCCGTAACAGAGCTGCA-3'	
	<i>MYB65</i>	F:5'-GGTGTTTGGTTTGAAGGGGGCTCTG-3' R:5'-CGAGCATCTTGCACAATGGCGTCT-3'	
	<i>contig1105.7</i>	F:5'-CCCACAGGATTCATGGGCAA ACG-3' R:5'-GGCTGCCCGAAAGACCACCAAAAAG-3'	
	<i>contig252</i>	F:5'-GATTGGCCATTGGAGATTTCCCA-3' R:5'-CAACAACCCATTGCCACTGCCCTG-3'	
	<i>contig275</i>	F:5'-TGGGTCTGCTCTGTTCGGA-3' R:5'-GGAAGTGGGGAAGCA GGC-3'	
	<i>contig347</i>	F:5'-CTCGTCGGTTGGTTGTCC-3' R:5'-AAGCATCCAGCAAACCGC-3'	
	<i>contig389</i>	F:5'-GGAGAGCTTGAGCTGGC-3' R:5'-CACGTCGTTGGGAAGTC-3'	
	<i>contig454</i>	F:5'-ACCCCTCAAATGCACGCT-3' R:5'-CCTGACTGGCAGCCGCAT-3'	
	<i>contig551</i>	F:5'-TGGAAGTGGTGGCATTG-3' R:5'-TGGAAGTGGTGGCATTG-3'	
	<i>cca-miR159b</i>	<i>contig780</i>	F:5'-GCCCATTTTACCGCTTTG-3' R:5'-TCTCTCATTTTTCTCCCTTTCAT-3'
		<i>contig00675</i>	F:5'-AACCGCTCCGTAGATGG-3' R:5'-GTACTCTGCGTTGATACCACTACTGCTT-3'

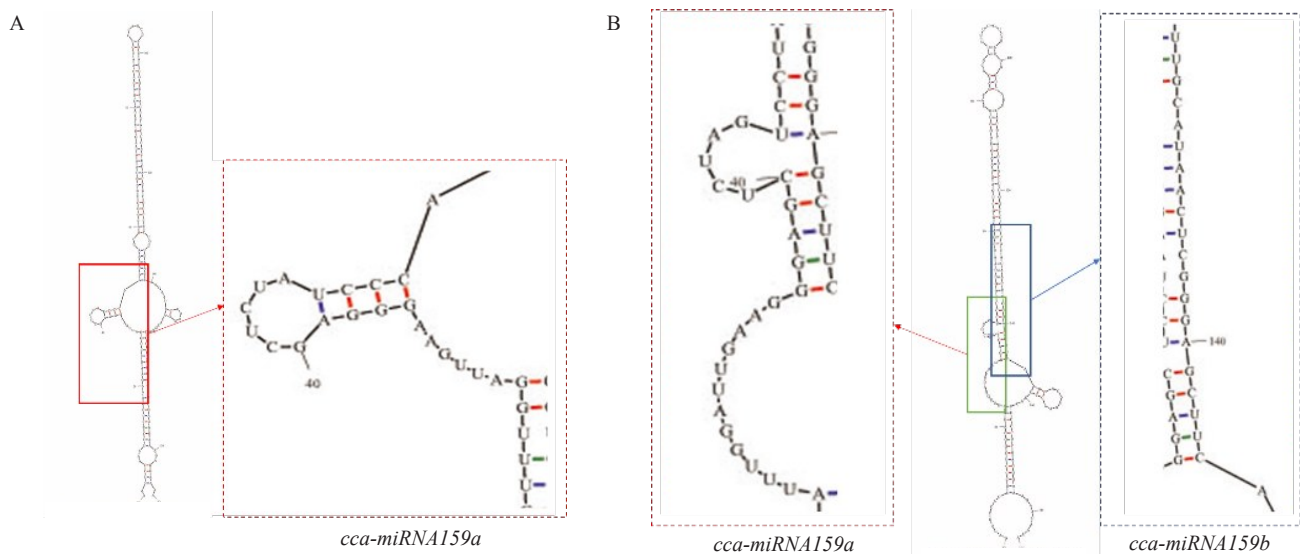
序^[27], 获得含有 *miR159* 前体序列的转基因拟南芥 T0 代。将其种子播种在含有潮霉素 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1/2MS 固体培养基中进行筛选, 待其生长 1 周左右, 移栽到培养基中, 直到将其培养到 T3 代。标记 20 株拟南芥, 每隔 2 d 对野生型拟南芥和转基因拟南芥进行观察, 记录叶片数量和开花时间, 将观察的数据

进行统计, 使用 Excel 2019 对统计数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 山核桃 *miR159* 基因家族的鉴定及进化分析

通过序列比对 (图 1), 发现其对应 2 种前体序列, 分别为 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2*。对山核



A. *cca-miR159.1* 前体序列包含 *cca-miR159a* 1 个成熟体; B. *cca-miR159.2* 前体序列包含 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 2 个成熟体。

A. The *cca-miR159.1* precursor sequence contains a mature body of *cca-miR159a*; B. The *cca-miR159.2* precursor sequence contains two mature bodies of *cca-miR159a* and *cca-miR159b*.

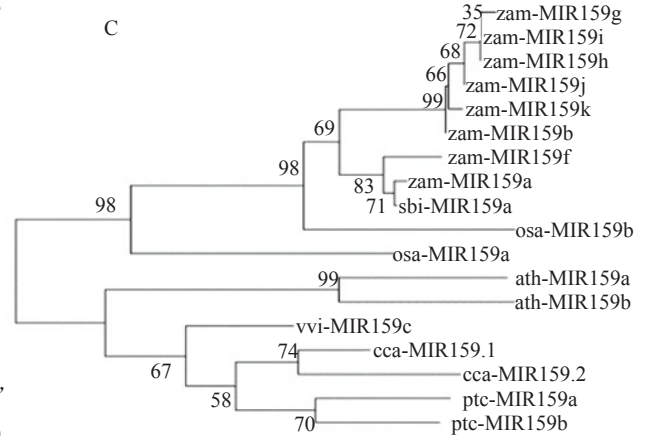
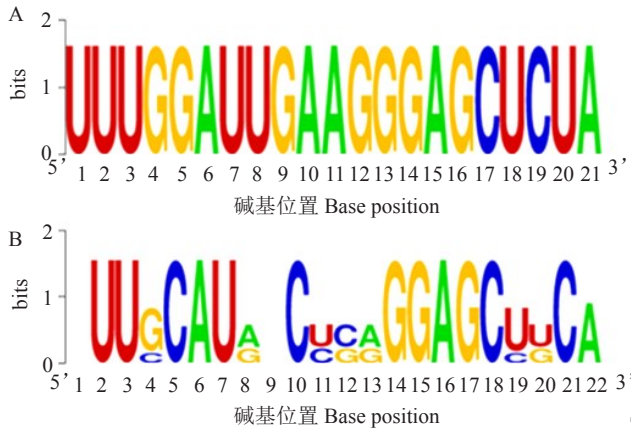
图 1 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 二级序列结构分析

Fig. 1 Sequence secondary structure analysis of *cca-miR159.1* and *cca-miR159.2*

桃 *miR159* 前体序列二级结构预测,发现 *cca-miR159.1* 只含有 *cca-miR159a* 1 个成熟体(图 1-A),而 *cca-miR159.2* 含有 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 2 个成熟体(图 1-B)。*cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 序列的保守性分析表明,*cca-miR159a* 的保守性明显高于 *cca-miR159b*,*cca-miR159a* 的碱基没有变化,而 *cca-miR159b* 在 4、8、9、11、12、13、20 的位置上碱基

变化差异较大(图 2-A、B)。通过构建前体序列进化树,发现山核桃与杨树、葡萄聚在同一亚族上,说明 *cca-miR159* 与 *Ptc-miR159* 亲缘关系更近。同时发现,*cca-miR159* 的 2 个前体序列都聚在了同一支上,可能在进化过程中出现了复制事件,发生了基因加倍现象(图 2-C)。

2.2 山核桃 *miR159* 靶基因预测



A. *miR159a* 碱基的保守性; B. *miR159b* 碱基的保守性; C. *miR159* 前体序列的进化关系分析。

A. Conservation of *miR159a* base; B. Conservation of *miR159b* base; C. Evolutionary relationship analysis of *miR159* precursor sequence.

图 2 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 的碱基保守性以及 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 的进化关系分析

Fig. 2 The base conservation analysis of *cca-miR159a*, *cca-miR159b* and the phylogenetic tree of *cca-miR159.1*, *cca-miR159.2*

通过 psRNATarget 在线分析软件对 *cca-miR159* 靶基因进行预测,结果如表 4 所示,*cca-miR159a* 在山核桃转录组数据库中有 11 个靶基因,将预测到的靶基因放到 TAIR 数据库中比对,发现 *cca-miR159a* 的靶基因主要为 MYB 家族,MYB 蛋白对细胞周期起重要的调控作用,MYB 蛋白主要是通过控制细胞

分裂的不同时期,实现对细胞周期的调控^[28]。如 *MYB33*、*MYB65*、*MYB97*、*MYB101*、*MYB81*、*DUO1*,其中 *MYB33* 与 *MYB65* 共同作用于花药与花粉发育,*DUO1* 为编码 R2R3 的转录因子,调节雄配子的形成,尤其是促进生殖细胞进入有丝分裂时期^[29]。*cca-miR159b* 在山核桃转录组数据库中预测到 2 个

表 4 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b* 靶基因的预测与分析

Table 4 Prediction of target genes and functions of *cca-miR159a*, *cca-miR159b*

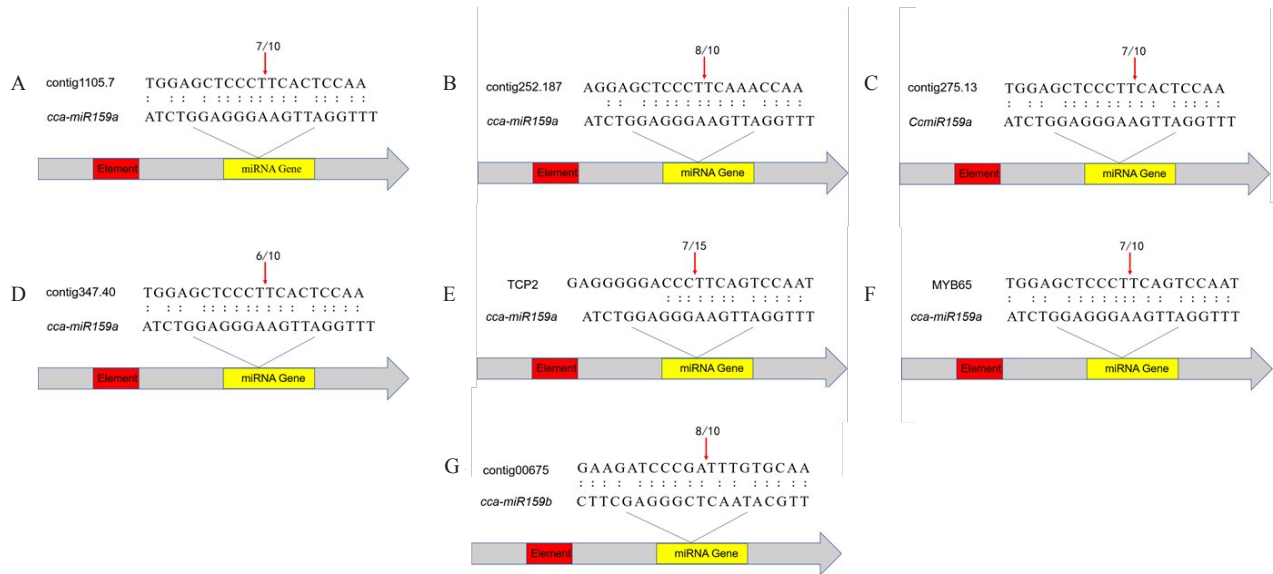
短链非编码 RNA miRNA	靶基因名称 Target gene name	拟南芥中的同源序列 Homologous sequences in <i>Arabidopsis</i>	功能注释 Function notes
<i>cca-miR159a</i>	<i>contig431.5</i>	AT4G40100	GRAM domain family protein
	<i>contig1105.7</i>	AT2G26960	AtMYB81, MYB81 myb domain protein 81
	<i>contig252.141</i>	AT5G55250	IAA carboxyl methyltransferase 1
	<i>contig252.187</i>	AT4G26930	MYB97, AtMYB97 myb domain protein 97
	<i>contig275.13</i>	AT5G06100	MYB33, AtMYB33 myb domain protein 33
	<i>contig347.70</i>	AT2G32460	MYB101, AtMYB101, ATM1 myb domain protein 101
	<i>contig389.122</i>	AT3G60460	DUO1 myb-like HTH transcriptional regulator family protein
	<i>contig431.102</i>	AT5G37330	Transposable element gene
	<i>contig551.16</i>	AT3G07565	Protein of unknown function
	<i>TCP2</i>	AT4G18390	TCP2 TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2
	<i>MYB65</i>	AT3G11440	AtMYB65, MYB65 myb domain protein 65
<i>cca-miR159b</i>	<i>contig780.23</i>	AT2G01180	ATPAP1, PAP1, LPP1, ATLPP1 phosphatidic acid
	<i>contig00675</i>	AT4G10790	UBX domain-containing protein

靶基因,在拟南芥数据库中比对,发现 contig780 对应的为 *API*,它在植物花分生组织及花器官形成过程中发挥着重要作用,*API* 的表达促使植物开花。contig00675 对应的为 *UBX* 蛋白,调节生长素的形成。

2.3 山核桃 *miR159* 靶基因剪切位点验证

通过 5' RACE,验证了 6 个 *cca-miR159a* 的靶基因和 1 个 *cca-miR159b* 的靶基因的切割位点。*cca-miR159a* 的靶基因为 contig1105.7、contig252.187、

contig275.13 和 contig347.10,对应的 MYB 家族基因为 *MYB33*、*MYB65*、*MYB101*、*MYB97*、*MYB120* 和 *TCP2*。MYB 家族的靶基因切割位点主要在第 11~12 碱基;而预测到 *TCP2* 靶基因切割位点在第 7~8 碱基占比为 2/15,在第 11~12 碱基占比为 11/15,在第 12~13 碱基占比为 1/15(图 3-A~F)。*cca-miR159b* 的靶基因 contig00675 切割位点在第 11~12 碱基占比为 4/5(图 3-G)。在拟南芥,水稻等模式植物中发现 miRNA 的靶基因切割位点基本在第 10~11 碱基,而



A~F. *cca-miR159a* 的靶基因的切割位点验证;G. *cca-miR159b* 的靶基因的切割位点验证;箭头表示剪切位点,数字代表在不同位置的切割片段的频率。

A-F. Verification of the cleavage site of target genes of *cca-miR159a*; G. Verification of the cleavage site of target genes of *cca-miR159b*; The arrow indicates the cleavage site, and the number represents the frequency of the cleavage fragment at different positions.

图 3 *cca-miR159* 靶基因切割位点验证
Fig. 3 Target gene of *cca-miR159* cleavage site

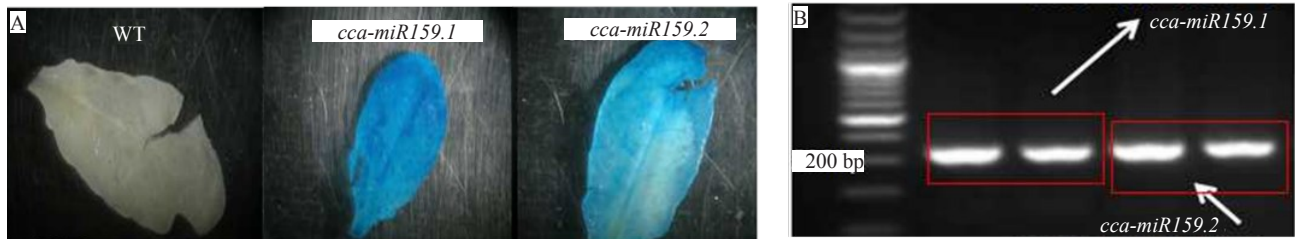
cca-miR159 的靶基因切割位点主要位于第 11 和 12 碱基,这表明靶基因的切割位点存在一定的差异。

2.4 山核桃 *miR159* 转基因植株阳性鉴定以及功能分析

通过对转基因植株和野生型植株叶片进行 GUS 染色(图 4-A),发现野生型的叶片呈现无色,而 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 转基因植株的叶片呈现蓝色。通过对转基因植株进行 PCR 验证,发现转基因植株均能扩出目的条带,且条带大小正确(图 4-B)。

通过农杆菌介导与花序侵染获得 *cca-miR159.1* 纯合的转基因阳性植株,对转基因和野生型拟南芥移植后 10、14 和 18 d 的叶片数目进行统计,发现转基因植株的叶片数目少于野生型植株,花期和野生

型花期无区别,未发生显著变化(图 5-A~B, D)。对野生型与转基因植株中 *miR159* 的靶基因表达量进行分析,发现 *MYB81* 在野生型中较 *cca-miR159.1* 转基因植株中表达量高,而 *MYB101*、*MYB33*、*MYB97* 在转基因植株中表达量较高(图 5-E),这可能是 *miR159* 只对 *MYB81* 起到降解作用,从而抑制叶片生长。*cca-miR159.2* 过表达植株与野生型拟南芥比较发现,转基因植株较野生型植株花期提前 10 d 左右,且叶片数目也相对减少(图 5-A, C, F),在对 *miR159* 靶基因表达量分析时,发现 *MYB101*、*MYB33*、*MYB65*、*MYB81* 和 *MYB97* 在 *cca-miR159.2* 转基因植株中表达量明显低于野生型(图 5-G),这可能是 *miR159* 作用于靶基因,对其起到降解作用,从而促

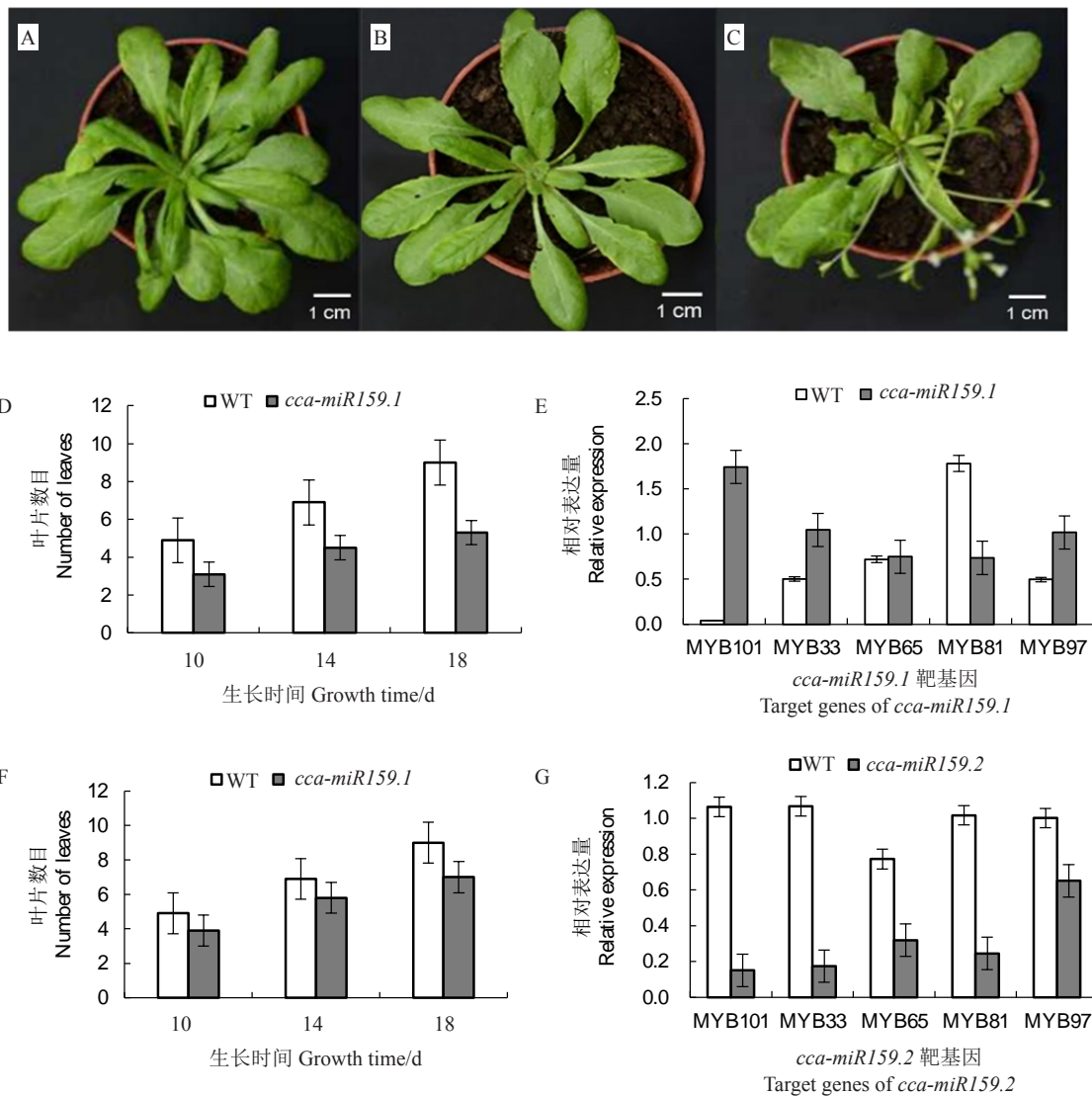


A. 野生型与转基因拟南芥 GUS 染色比较; B. 转基因拟南芥株系的 PCR 鉴定。

A. Comparison of GUS staining between *Arabidopsis* of wild-type and transgenic; B. PCR identification in *Arabidopsis* of transgenic lines.

图4 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 转基因植株验证

Fig. 4 Verification of *cca-miR159.1* and *cca-miR159.2* transgenic plants



A. 野生型表型; B. *cca-miR159.1* 转基因表型; C. *cca-miR159.2* 转基因表型; D. 不同生长天数下野生型与 *cca-miR159.1* 转基因叶片数目; E. *cca-miR159.1* 靶基因表达分析; F. 不同生长天数下野生型与 *cca-miR159.2* 转基因叶片数目; G. *cca-miR159.2* 靶基因表达分析。

A. Wild-type phenotype; B. Transgenic phenotype of *cca-miR159.1*; C. Transgenic phenotype of *cca-miR159.2*; D. Leaf numbers of wild-type and *cca-miR159.1* under different growth days; E. Target gene expression analysis of *cca-miR159.1*; F. Leaf numbers of wild-type and *cca-miR159.2* under different growth days; G. Target gene expression analysis of *cca-miR159.2*.

图5 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2* 转基因植株形态观察以及靶基因表达分析

Fig. 5 Morphological observation and target gene expression analysis of *cca-miR159.1* and *cca-miR159.2* transgenic plants

进植株提早开花并使叶片减少。试验结果表明, *cca-miR159a* 与 *cca-miR159b* 的功能存在差异, 并且 *cca-miR159b* 具有促进植物开花的作用。

3 讨 论

随着对 *miR159* 的深入研究, 越来越多物种中的 *miR159* 家族基因相继被鉴定出来。在植物中, *miR159* 的研究主要集中于模式植物, 并且 *miR159* 主要对植物的花发育有一定的影响, 而在林木中对于 *miR159* 的功能研究却相对较少。本研究在山核桃中成功克隆了2条 *miR159* 前体序列, 分别命名为 *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2*。其中 *cca-miR159.1* 中只含有1个成熟体 *cca-miR159a*, *cca-miR159.2* 中含有2个成熟体 *miR159a* 和 *miR159b*。*miR159* 家族在不同物种中具有较高的保守性, 如拟南芥^[30]、水稻^[31]、小麦^[32], 而对山核桃 *miR159* 成熟体的保守性分析发现, *cca-miR159a* 成熟体序列具有高度保守性, 而 *cca-miR159b* 成熟体序列保守性较差, 这可能与它在植物中发挥作用的差异有关。

研究表明, *miR159* 在拟南芥的营养生长到生殖生长转折时期发挥着重要作用^[33]。而笔者发现, *cca-miR159* 具有抑制转基因植株营养生长的功能。山核桃 *miR159* 的靶基因主要为 MYB 基因家族, 并且其他植物 *miR159* 的靶基因也主要为 MYB 基因家族, 这也证明保守的 miRNA 具有保守的靶基因, 并通过靶基因调节植物生长发育。在拟南芥中 *MYB33*、*MYB65*、*MYB120* 都是 *miR159* 的靶基因, *miR159* 对靶基因均有剪切作用, 且剪切位点一般在第10~11碱基^[34], 而山核桃靶基因的剪切位点在第11~12碱基, 这可能在不同的植物中存在差异。

植物开花途径受到 miRNA 调控, 其中 *miR156* 和 *miR172* 是2个关键的调控因子^[35-36]。在拟南芥中, *miR156* 和 *miR172* 通过下调靶基因的表达调控开花时间, 且二者具有相反的作用。在植物由营养生长向生殖生长转变的过程中, *miR156* 的表达量降低, 而 *miR172* 的表达量升高^[36-37]。*miR172* 是高等植物中保守的 miRNA, 在转录或翻译水平上作用于花器官基因 *AP2* 和 *AP2-like*^[38-39]。如在拟南芥种子萌发后, *miR172* 表达量逐渐升高, 调控着拟南芥由幼年向成年期的转变。此外, *miR172* 还通过形成远轴面毛状体来维持成叶的特性, 过表达 *miR172* 植株中拟南芥萼片和花瓣向心皮转化, 雄蕊数量减

少^[39]。除此之外, 以上 miRNA 在其他物种中也有研究, 如在玉米中, *miR156* 在幼年的生长阶段表达量较高, 在生长成熟的阶段其表达量又会逐渐降低。在水稻中, *miR172* 在其生长发育阶段, 通过抑制靶基因 *SMZ* 和 *SNZ* 的表达, 从而对花发育起到促进作用^[40-42]。除 *miR156* 和 *miR172* 两个主要的开花调控 miRNA 外, *miR167* 也影响着植物的开花过程, 山核桃 *miR167* 在雌花芽分化后期表达上调, 表明其在山核桃雌花芽分化过程中具有重要的作用。而本研究表明 *cca-miR159a* 对植物的花期不具有作用, *cca-miR159b* 对植物的花期具有一定的促进作用, 表明只有 *cca-miR159b* 对植物的花期具有促进作用。山核桃是如何通过 *miR159* 调控靶基因发挥作用进而影响植物的生长发育, 这将是课题组接下来研究的重点, 从而进一步完善山核桃花发育的调控网络图, 为山核桃成花调控提供理论依据。

4 结 论

从山核桃中成功克隆出了2条 *miR159* 的前体序列, *cca-miR159.1* 和 *cca-miR159.2*。*cca-miR159.1* 中只含有1个 *miR159* 成熟体 *cca-miR159a*, *cca-miR159.2* 中含有2个 *miR159* 成熟体 *cca-miR159a* 和 *cca-miR159b*。进化分析发现山核桃与杨树聚类在一起, 与杨树的进化关系最近。对 *cca-miR159* 靶基因预测, 靶基因主要为 MYB 家族, 并且对靶基因切割位点进行了验证, 表明切割位点基本在第11和12碱基。对 *miR159* 靶基因表达特性进行分析以及异源转化拟南芥, 结果表明, *miR159* 可能通过降解靶基因, 抑制靶基因的表达, 从而发挥作用。*cca-miR159.1* 过表达抑制叶片的生长, 而 *cca-miR159.2* 过表达不仅抑制叶片生长, 而且促进植物开花。

参考文献 References:

- [1] ZHENG J W, JIAN Q H, FANG F C, BING S Z. Cloning and characterization of a homologue of the FLORICAULA/LEAFY gene in hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30: 794-805.
- [2] LEV Y Y, DEAN C. Control of flowering time[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(1): 49-54.
- [3] BASTIAS A, ALMADA R, ROJAS P, DONOSO J M, PHIN-RICHSEN P, SAGREDO B. Aging gene pathway of microRNAs 156/157 and 172 is altered in juvenile and adult plants from *in vitro* propagated *Prunus* sp.[J]. Ciencia e Investigación Agraria, 2016, 43(3): 429-441.

- [4] BARTEL B, BARTEL D P. MicroRNAs: at the root of plant development[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 709-717.
- [5] BARTEL D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] 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.
- [7] PARK M Y, WU G, GONZALEZ-SULSER A, VAUCHERET H, POETHIG R S. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(10): 3691-3696.
- [8] WANG J F, ZHOU H, CHEN Y Q, LUO Q J, QU L H. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1688-1695.
- [9] RAMANJULU S, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16: 2001-2019.
- [10] WU L, ZHOU H, ZHANG Q, ZHANG J, NI F, LIU C, QI Y. DNA methylation mediated by a microRNA pathway[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(3): 465-475.
- [11] KHRAIWESH B, ARIF M A, SEUMEL G, OSSOWSKI S, WEIGEL D, RESKI R, FRANK W. Transcriptional control of gene expression by microRNAs[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 111-122.
- [12] ELEONORA S, STEPHEN J. The role of microRNAs in the control of flowering time[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(2): 365-380.
- [13] LUO Y, GUO Z H, LI L. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development[J]. *Developmental Biology*, 2013, 380(2): 133-144.
- [14] WU J, WANG D F, LIU Y F, WANG L, QIAO X, ZHANG S L. Identification of miRNAs involved in pear fruit development and quality[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 953.
- [15] SUJAY P, ANIRBAN K, AMITA P. Identification and validation of conserved microRNAs along with their differential expression in roots of *Vigna unguiculata* grown under salt stress[J]. *Plant Cell*, 2011, 105(2): 233-242.
- [16] ZHU J F, LI W F, YANG W H, QI L W, HAN S Y. Identification of microRNAs in *Caragana intermedia* by high-throughput sequencing and expression analysis of 12 microRNAs and their targets under salt stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(9): 1339-1349.
- [17] QIAO Q H, WANG X Y, YANG M Y, ZHAO Y J, GU J T, XIAO K. Wheat miRNA member TaMIR2275 involves plant nitrogen starvation adaptation via enhancement of the N acquisition-associated process[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40(10): 183.
- [18] LI S F, FAN C M, LI Y, ZHANG J H, SUN J S, CHEN Y H, TIAN C Y, SU X H, LU M Z, LIANG C Z, HU Z M. Effects of drought and salt-stresses on gene expression in *Caragana korshinskii* seedlings revealed by RNA-seq[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 200.
- [19] NIU K N, SHI Y, MA H L. Selection of Candidate reference genes for gene expression analysis in Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) under abiotic stress[J]. *Front Plant Science*, 2017, 8:193.
- [20] 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.
- [21] 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 *VvGAMYB* 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.
- [22] 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.
- [23] 马丽,周丽,徐航,全绍文,杨洁萍,牛建新. ‘库尔勒香梨’ miR159 家族成员进化特性及表达分析[J]. *果树学报*,2019,36(1): 1-10.
- MA Li, ZHOU Li, XU Hang, QUAN Shaowen, YANG Jieping, NIU Jianxin. Evolutionary characteristics and the expression patterns of miR159 gene family in ‘Kuerlexiangli’ pear[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(1): 1-10.
- [24] 包海,孙丰硕,徐千惠,王延伟. 杨树 10 种 miRNA 的低氮胁迫差异表达及靶基因的鉴定与分析[J]. *分子植物育种*,2019,17(3): 771-779.
- BAO Hai, SUN Fengshuo, XU Qianhui, WANG Yanwei. Differential expression of 10 miRNAs in poplar under low nitrogen stress and the identification and analysis of target genes[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(3): 771-779.
- [25] WANG Z J, HUANG J Q, HUANG Y J, LI Z, ZHENG B S. Discovery and profiling of novel and conserved microRNAs during flower development in *Carya cathayensis* via deep sequencing[J]. *Planta*, 2012, 236(2): 613-621.
- [26] 刘晓菊,洪海波,李敏,刘媛,杨克强. 改良 CTAB 法提取核桃总 RNA 试验[J]. *山东农业科学*,2008(1): 97-99.
- LIU Xiaojun, HONG Haibo, LI Min, LIU Yuan, YANG Keqiang. An improved CTAB method for extracting total RNA from walnut[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2008(1): 97-99.

- [27] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [28] CHRISTIAN D, RALF S, ERICH G, BERND W, CATHIE M, LOIC L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends Plant Science*, 2010, 15(10): 573-581.
- [29] RALF S, MARTIN W, BERND W. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447-456.
- [30] CHRISTOPHER M, LINCOLN S, DOREEN W. Evolution of *Arabidopsis* microRNA families through duplication events[J]. *Genome Research*, 2006, 16(4): 510-519.
- [31] GUO C, LI L, WANG X F, LIANG C. Alterations in siRNA and miRNA expression profiles detected by deep sequencing of transgenic rice with siRNA-mediated viral resistance[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): 175.
- [32] 刘霞,张斌,毛新国,李昂,孙美荣,景蕊莲. 小麦 tae-MIR156 前体基因的克隆及其靶基因 TaSPL17 多态性分析[J]. *遗传*, 2014, 36(6): 592-602.
LIU Xia, ZHANG Bin, MAO Xinguo, LI Ang, SUN Mengrong, JING Ruilian. Cloning of tae-MIR156 precursor gene and sequence polymorphisms of tae-miR156 targeted TaSPL17[J]. *Hereditas*, 2014, 36(6): 592-602.
- [33] MARIA M, LI J Y, LI Y J, ROBERT S A, WENDELIN S, STEPHEN O, ROSEMARY G W, ANTHONY A M. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 757-771.
- [34] CESAR L, XIE Z X, KRISTIN D K, JAMES C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [35] LEVI Y, JOHANNES M, THANH T D, FELIX O, CHRISTA L, HEIKE W, CHEN X M, MARKUA S. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(7): 2156-2170.
- [36] WANG J W, BENJAMIN C, DETLEF W. miR156-Regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738-749.
- [37] JUNG J H, SEO Y H, SEO P J, REYES J L, YUN J, CHUA N H, PARK C M. The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2736-2748.
- [38] REBECCA S, JAVIER F P, MARKUS R, CARLA S, MARKUS S, DETLEF W. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. *Developmental Cell*, 2005, 8(4): 517-527.
- [39] CHEN X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [40] RAMANJULU S, ZHOU X F, ZHENG Y, ZHANG W X, ZHU J K. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 25.
- [41] PATRICK A, ALAN H, DAVID C B, NICHOLAS P H. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA[J]. *Development*, 2004, 131(14): 3357-3365.
- [42] CHUNCK S, TOBIAS C, SUN L, RAEMER F K, LI C L, DIBBLE D, ARORA R, BRAGG J N, VOGEL J P, SINGH S, SIMMONS B A, PAULY M, HAKE S. Overexpression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 17550-17555.