

# 砂梨 miR159 家族进化特性及在 冬季休眠的表达模式分析

刘瑾航<sup>1</sup>, 沈炳荣<sup>2</sup>, 李宜轩<sup>1</sup>, 梁沁<sup>3</sup>, 冯宇<sup>1</sup>,  
林晓洁<sup>1</sup>, 沈茂芬<sup>2</sup>, 吴少华<sup>1</sup>, 李亮<sup>4\*</sup>, 李永裕<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>福建农林大学园艺学院, 福州 350002; <sup>2</sup>福建省漳州市诏安县农业农村局, 福建漳州 363000;

<sup>3</sup>四川省广安市广安区农业农村局, 四川广安 638550; <sup>4</sup>福建省农业科学院果树研究所, 福州 350002)

**摘要:**【目的】探究砂梨 miR159 家族成员进化特性及其在梨花芽休眠进程中的作用。【方法】通过检索已构建的砂梨 (黄花) miRNA 文库, 筛选鉴定出 2 个 miR159 成熟体和 2 个前体序列, 分别为 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b*、*ppy-MIR159a* 和 *ppy-MIR159b*。从黄花梨中克隆得到 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b*。通过生物信息学分析梨 miR159 家族。采用实时荧光定量测定梨两个 miR159 家族成员及其靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* (*GAMYB* 转录因子) 在梨花芽休眠进程中以及单氰胺 (HC) 处理梨休眠花芽的变化。【结果】植物 miR159 家族成熟体进化树的结果显示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, 说明了黄花梨与其他物种在进化过程中高度保守。而在进化树中出现各种小分支, 说明 miR159 家族在进化过程由于功能分化, 其成熟序列也出现相应的碱基改变。两个 miR159 家族成员的前体均能形成环状结构, 且成熟体都在 3' 臂。 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的最小折叠自由能 ( $\Delta G$ ) 分别为  $-368.81 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-352.96 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。进化树分析发现梨 miR159 的亲缘关系与苹果更为接近。梨 miR159 调控的潜在靶基因主要是 MYB 家族基因, 它与 GA 的调控有关, 另外两个 miR159 的其他潜在靶基因并不完全相同, 还包括蛋白激酶、细胞色素等功能不同的蛋白基因。在梨花芽休眠进程中, 梨 miR159 相对表达量在整个休眠期间呈现先下降后上升再下降的双峰动态变化, 靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达趋势与 miR159 相反, 呈现先上升后下降再上升的变化, 且 miR159 和靶基因的表达量均在休眠解除时期出现显著变化; 而单氰胺 (HC) 处理梨休眠花芽的定量结果显示, 随着 HC 破眠处理时间的增加, miR159 的表达量降低, 靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达量升高, 靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 变化趋势与 miR159 相反。【结论】两个 miR159 家族成员的潜在靶基因主要是 MYB 家族基因。梨花芽可能通过下调 miR159 表达, 促进 *GAMYB* 表达, 提高 GA 含量, 促进花芽冬季休眠的解除。另外靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 和 *DELLA* 基因的表达模式类似。

关键词: 砂梨; 休眠; miR159; 表达模式; 进化特性

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)11-2007-12

## Molecular evolution of miR159 family and their expression profiling during dormancy of *Pyrus pyrifolia* in the winter

LIU Jinhang<sup>1</sup>, SHEN Bingrong<sup>2</sup>, LI Yixuan<sup>1</sup>, LIANG Qin<sup>3</sup>, FENG Yu<sup>1</sup>, LIN Xiaojie<sup>1</sup>, SHEN Maofen<sup>2</sup>, WU Shaohua<sup>1</sup>, LI Liang<sup>4\*</sup>, LI Yongyu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; <sup>2</sup>Agricultural and Rural Bureau of Zhao'an County, Zhangzhou City, Fujian Province, Zhao'an 363000, Fujian, China; <sup>3</sup>Agricultural and Rural Bureau of Guang'an District, Guang'an City, Sichuan Province, Guang'an 638550, Sichuan, China; <sup>4</sup>Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** 【Objective】 Pear and other deciduous fruit trees have low temperature dormancy in winter. The study and elucidation of the mechanism of winter dormancy and release of flower buds of southern

收稿日期: 2022-04-07 接受日期: 2022-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501694, 31902067); 高等学校博士学科点专项科研基金 (2011351511011); 福建农林大学科技创新专项基金 (cxzx2017170, cxzx2018083); 福建省漳州市诏安县农业农村局 2021 年服务类采购项目 ([350624]XYX[CS]2021012-1)

作者简介: 刘瑾航, 男, 硕士, 研究方向为花卉分子生物技术。Tel: 18450077998, E-mail: 719036278@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13174524686, E-mail: 494027402@qq.com; Tel: 18960858487, E-mail: lilin3182@163.com

early-ripening pears can provide reference for pear production in southern China. GA is an important hormone for plant growth and development and plays an important role in regulating dormancy. MiRNAs have important roles in plant growth and development. *MiR159* is a widely present and conserved miRNA that targets and regulates multiple *MYB* genes. *MYB* genes are induced by gibberellin (GA) and involved in the GA signaling pathway. This study explored the evolutionary characteristics of *miR159* gene family and its expression pattern during the dormancy process of pear. **【Methods】** In this paper, two mature and two precursor sequences of *miR159* family were obtained from miRNA library of Huanghua pear. They were *ppy-miR159a*, *ppy-miR159b*, *ppy-MIR159a* and *ppy-MIR159b*. *ppy-miR159a* and *ppy-miR159b* were cloned from the bud of Huanghua. Changes in these two pear *miR159* members and their target gene *pyrus\_GLEAN\_10035941* (GAMYB transcription factor) during the process of pear flower bud dormancy were determined by real-time PCR analysis. In the treatment group, 1% cyanamide (HC) was used to treat the pear branches during endodormancy period, and spraying water was used for the control group. The two *miR159* family members and their target gene *pyrus\_GLEAN\_10035941*(GAMYB transcription factor) were determined. expression changes. The role of *miR159* family in pear flower bud dormancy process was analyzed. **【Results】** The results of the phylogenetic tree of the mature *miR159* family in plants showed that in the large branch of the phylogenetic tree, the base sequence of the *miR159* family were highly overlapped, and most of the *miR159* families had the same sequence, suggesting that miR159 is highly conserved in the evolutionary process. Various small branches appeared in the evolutionary tree, indicating that the *miR159* family also had some base changes in its mature sequence due to functional differentiation during the evolution process. The precursors of both *miR159* family members can form a ring structure, and the mature bodies are both at the 3' arm. The minimum folding free energy ( $\Delta G$ ) of different members of the *miR159* family measured by RNAfold was  $-88.15 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $-84.36 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , respectively, indicating that the members of the *miR159* family are structurally stable. Phylogenetic analysis found that the affinity of *miR159* of pear was more closely related to apple. The mature sequence of the *miR159* family member in 'Huanghua' pear is highly conserved, with changes only at position 1 and 20. PsRNA target prediction showed that potential target genes of *miR159* were *MYB* family genes, which are related to the regulation of GA. Other potential target genes of the two *miR159s* included cytochrome and protein kinase and were not exactly the same. qRT-PCR analysis showed that a dynamic change pattern of “decline-rise-decline” in *miR159* expression was observed during the dormancy process of pear bud. The results showed a downward trend in general, and the expression levels in S3 and S5 stages were significantly reduced. The expression trend of the target gene *pyrus\_GLEAN\_10035941* is opposite to that of *miR159*, which was in a “rise-decline-rise” pattern. It is speculated that *miR159* may play a role in regulating the dormancy process of pear flower buds by regulating the expression of GAMYB-related target gene *pyrus\_GLEAN\_10035941*. The budbreak rate in the group treated with HC was 93.05%, while that in the control group was 10.48%. The expression of *miR159* was decreased and its target gene *pyrus\_GLEAN\_10035941* increased by HC treatment. **【Conclusion】** *miR159* contained two mature forms, i.e. *ppy-miR159a/b* in pear. The target genes of the *ppy-miR159a/b* was mainly *MYB* family genes. The release of winter dormancy in pear flower buds may be promoted with down-regulating *miR159* and upregulating of *GAMYB* and by GA application. The possible mechanism of *miR159* regulating pear flower bud dormancy process via regulating GA signaling pathway needs to be further studied. In addition, the expression patterns of target genes, *pyrus\_GLEAN\_10035941* and *DELLA*, are similar, and whether there is a regulatory relationship between these two genes and miR159 is worth exploring in subsequent studies.

**Key words:** *Pyrus pyrifolia*; Dormancy; MicroRNA159; Expression pattern; Molecular evolution

砂梨 [*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai] 为蔷薇科桃亚科梨属的多年生落叶乔木果树,果实具有果型大、肉质细腻、清甜多汁等特点,是中国梨的四大栽培种(白梨、砂梨、秋子梨和新疆梨)之一,原产于中国长江流域及以南地区。联合国粮农组织统计数据库(FAO, <http://www.fao.org>)和国家统计局(<http://www.stats.gov.cn>)的数据显示,截止到2019年中国梨种植面积达94.07万 $\text{hm}^2$ ,总产量为1 731.4万t,占同年全世界总产量的71.45%,同时梨也是我国仅次于苹果、柑橘的第三大水果<sup>[1]</sup>,中国的江浙地区、四川、湖北、福建等地都是砂梨的主要产区。

我国的早熟梨主要指适应长江流域及其以南地区栽培的砂梨品种。南方早熟梨的成熟时间一般在7月到8月上旬,而北方梨品系果实成熟期大多集中在9月下旬至10月上旬。南方早熟梨不仅可以满足消费者在夏暑伏季对鲜梨的需求,而且可以平衡我国的梨产业结构。因此,早熟梨拥有广阔的市场前景,大力发展南方早熟梨产业,有其独特的优势。然而,梨等落叶果树具有冬季低温休眠的特性,随着全球气候变暖和暖冬现象的不断出现,造成早熟梨冬季休眠的低温积累不足,阻碍休眠进程,导致第二年梨花芽萌发率下降,产量变低,品质变差<sup>[2-3]</sup>,给果农的种植经济效益和生产热情带来了较大的冲击。选育和推广梨短低温品种是发展早熟梨产业的重要抓手。因而,研究和阐明梨花芽冬季休眠和解除的机制,可为梨短低温品种的选育提供指导。

microRNA(miRNA)是一类广泛存在于生物中的非编码单链RNA,它的长度为18~24个碱基(nt)。Lee等<sup>[4]</sup>首次在秀丽隐杆线虫中发现长度约为22 nt的miRNA即lin-4的存在,并且lin-4能抑制编码基因lin-14的表达。此后这一类低RNA分子引起了人们的高度关注。miRNA初期的研究主要集中在动物上,而植物miRNA的研究相对较晚,植物中关于miRNA的研究最早在2002年从拟南芥中克隆并命名了16个miRNA<sup>[5-6]</sup>。在植物生长过程中,miRNA发挥关键的调控作用,参与植物的发育生长、信号转导及胁迫响应等过程<sup>[7]</sup>。miRNA在植物休眠的调控中也发挥着作用。在水稻中miR156通过赤霉素途径调控种子的休眠<sup>[8]</sup>,miR169及其靶基因PagHAP2-6受ABA调控参与杨树形成层休眠<sup>[9]</sup>。日本杏花芽休眠的研究表明,miR169和Pm-RGL2协同调节NUCLEAR FACTOR-Y,导致GA<sub>4</sub>诱

导休眠解除<sup>[10]</sup>。Zhang等<sup>[11]</sup>对牡丹花芽在低温休眠释放过程中的miRNA进行测序和鉴定时发现,miR168家族参与了花芽的休眠释放和维持。已有研究表明miR159在植物界中广泛存在且高度保守,能够靶向调控多个MYB基因,MYB基因受到赤霉素(GA)诱导,是GA信号途径中的关键基因,因此又叫GAMYB基因。植物表达出的miR159与GAMYB的结合位点相结合,降解GAMYB基因,从而抑制GAMYB基因的表达<sup>[12]</sup>。GA有打破植物芽休眠的作用,有研究指出GA表达水平的增长是内休眠解除所必需的<sup>[13]</sup>;GA<sub>4</sub>能够解除杨树的休眠<sup>[14]</sup>;在梨树上,用6-BA和GA<sub>3</sub>处理花芽,能够促进花芽休眠的解除<sup>[15]</sup>。另外,在GA调控的植物开花过程中,miR159发挥重要作用,调控机制为转录后调控<sup>[16]</sup>。因此,研究miR159在多年生植物休眠中的作用,有助于揭示多年生植物的休眠机制。

miRNA参与了梨花芽冬季休眠的调控<sup>[2-3,17]</sup>,但miRNA调控梨花芽休眠的作用机制尚不明确。笔者课题组在前期的研究中发现,miR159家族的表达量在梨花芽冬季休眠的不同阶段出现明显的波动<sup>[17]</sup>;而且梨花芽中GA<sub>3</sub>的含量在休眠进程中出现明显变化,在内休眠和生态休眠解除临界期达到最大值,而在萌动时急剧下降<sup>[18]</sup>,表明miR159和GA<sub>3</sub>对梨芽休眠具有调节作用。miR159可能通过调控GA关键途径的基因从而参与调控梨花芽休眠的进程,但其调控机制还需进一步的研究阐明。因此,本文通过克隆黄花梨中miR159家族的成熟体序列,构建成熟体序列和前体序列系统进化树,预测前体二级结构,分析成熟体保守性,预测靶基因等,阐明梨miR159家族的进化特征,并分析miR159家族及潜在靶基因在梨花芽冬季休眠进程中的表达模式,从而为研究miR159家族在砂梨花芽休眠中的作用提供参考,也为阐明miRNA调控木本植物芽休眠的机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

黄花梨采自福建省三明市建宁县高镇村梨园。参考前人的方法<sup>[2-3,17]</sup>,于2018年11月22日(S1)、2018年12月7日(S2)、2018年12月22日(S3)、2019年1月7日(S4)、2019年1月22日(S5)进行梨枝条采样。选择树势中庸、生长较一致的梨树作为采样



母株,挑选树冠外围生长发育良好的一年生枝条,用湿布包裹好带回实验室。每次至少采90根枝条(每15根枝条一个重复,每个枝条约20个芽),取其中的45根枝条参考Yamane等<sup>[19]</sup>和Li<sup>[2-3]</sup>的方法,采用清水插枝法统计梨花芽的萌芽率;再取45根枝条,采集枝条上的饱满花芽,用镊子去除芽体的鳞片和绒毛,镊取花芽原基,经液氮速冻后,在-80℃冰箱保存备用,用于后续的试验分析。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 清水插枝法统计梨花芽的萌芽率** 参考Yamane等<sup>[19]</sup>和Li等<sup>[2-3]</sup>的方法,采用清水插枝法统计休眠期间梨花芽的萌芽率,将花芽萌芽率<10%定义为内休眠状态,萌芽率在10%~50%之间定义为内休眠状态到生态休眠转换的阶段,萌芽率≥50%定义为休眠解除状态。将3组离体枝条(每组15枝)基部斜剪,以淹没枝条基部2~3 cm为基准放在盛有单蒸水的培养瓶中,放置在人工气候箱中进行培养,培养箱条件:光阶段,12 h,100%光照,(25±1)℃温度,75%湿度;暗阶段,12 h,0%光照,(20±1)℃温度,75%湿度。每3 d剪除少许梨枝条基部,并更换新鲜的单蒸水。培养21 d后统计萌芽率。

**1.2.2 单氰胺破眠处理** 取2018年12月7日采集的处于内休眠时期的梨枝条,采用1%(w)的HC作为破眠剂,均匀喷洒在梨枝条表面,确保每个花芽表面都喷湿,晾干后转移至适宜条件的人工气候箱,培养箱条件同1.2.1。以喷洒清水作为试验对照组,每个处理组和对照组均设置3个独立生物学重复(每个生物学重复均为15根枝条),分别于未处理(CK)、处理后12 h(HC1)、72 h(HC2)、216 h(HC3)收集花芽,镊取花芽原基,经液氮速冻后在-80℃冰箱保存备用。为定义梨花芽的休眠状态,从处理组和对照组中,分别随机选取15根枝条,参照1.2.1方法统计萌芽率。

**1.2.3 黄花梨 miR159 成熟序列和前体序列的获取** 通过检索实验室前期构建的砂梨(黄花)miRNA文库<sup>[17]</sup>,从中筛选鉴定出2个 miR159 成熟体和2个前体序列,分别命名为 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b*、*ppy-MIR159a* 和 *ppy-MIR159b*。

**1.2.4 黄花梨芽总 RNA、miRNA 的提取和 cDNA 的合成** 利用 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(无 DNA 残留型)(博日科技有限公司,中国杭州)和 miRcute Plant miRNA Isolation Kit miRcute 试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京)分别提取梨花芽总 RNA 和 miRNA;再利用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(全氏金生物技术有限公司,中国北京)和 TransScript miRNA First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (加尾法)试剂盒(全氏金生物技术有限公司,中国北京)分别参照说明书合成 mRNA 和 miRNA 定量所需的 cDNA,存放在-20℃备用。

**1.2.5 引物设计** 利用得到的 *miR159* 成熟序列设计上游引物(表1),送铂尚生物科技有限公司负责合成引物,下游引物是通用引物,由 TransScript miRNA First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(加尾法)试剂盒(全氏金生物技术有限公司,中国北京)提供。

**1.2.6 梨 miR159 家族成熟体克隆** PCR 反应体系根据 2×EasyTaq PCR SuperMix (+dye)克隆试剂盒(全氏金生物技术有限公司,中国北京)说明书,PCR 反应程序:第一步在 94℃ 下反应 2~5 min 进行预热,第二步在 94℃ 下变性 30 s,第三步在 50~60℃ 下退火 30 s,第四步在 72℃ 下延伸 1~2 kb·min<sup>-1</sup>。第二步到第四步进行 30~35 循环,最后在 72℃ 下延伸 5~10 min。将得到的扩增产物进行 1%(w)琼脂凝胶电泳验证。按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京)说明书进行胶回收,纯化目的条带,将收集的 DNA 溶液通过 1%琼脂凝胶电泳验证。采用 pM-

表 1 试验所用引物

Table 1 The primers used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Purpose
<i>ppy-miR159a</i>	GTTTGATTGAAGGGAGCTCTA	Clone and qRT-PCR
<i>ppy-miR159b</i>	GCTTGGATTGAAGGGAGCTCC	Clone and qRT-PCR
<i>pyrus_GLEAN_10035941-F</i>	ATGCCGTTTCAGAAGCACTCA	qRT-PCR
<i>pyrus_GLEAN_10035941-R</i>	CCCCATCTTGGCATGGAGTT	qRT-PCR
<i>PpActin-F</i>	CCATCCAGGCTGTTCTCTC	qRT-PCR
<i>PpActin-R</i>	GCAAGGTCCAGACGAAGG	qRT-PCR
<i>5S rRNA</i>	GAAAGATGCCAATTCATGCC	qRT-PCR

D<sup>TM</sup>18-T Vector Cloning Kit 试剂盒(宝日医生物技术有限公司,中国北京)对目的DNA片段进行连接转化。送铂尚生物科技有限公司进行测序。

1.2.7 梨 *miR159* 的系统进化分析 从 miRbase 数据库(<http://www.mirbase.org/>)在线网站下载拟南芥、柑橘、葡萄、毛果杨、苹果、甜瓜、番茄的 *miR159* 家族成员的前体序列和成熟序列。利用 MEGA6.0 软件将以上物种的 *miR159* 成熟序列和前体序列进行多重比对。比对结果用邻近法(Neighbor-joining, NJ)构建 *miR159* 成熟序列进化树。参数均为默认。

1.2.8 梨 *miR159* 前体二级结构分析和成熟体保守性分析 使用 miRDeep2 软件预测前体序列信息。利用 ViennaRNA 在线软件中的 RNAfold(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>),按其默认参数分析梨 *miR159* 家族前体序列的二级结构,同时进行最小折叠自由能(dG)分析;通过在线平台 WebLOGO 对梨 *miR159* 成熟序列的保守性进行分析。

1.2.9 梨 *miR159* 靶基因预测 使用 Target Finder 软件和在线数据库 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)对两个 *miR159* 的靶基因进行预测。比对的数据库为砀山酥梨数据库(从 NCBI 数据库下载),参数设置为默认值。

1.2.10 实时荧光定量检测 *miR159* 和靶基因的表达量 使用罗氏 LightCycler<sup>®</sup>96 仪器(Roche 罗氏公司,瑞士巴塞尔)以及 TransStart Top Green qPCR SuperMix 定量试剂盒(全式金生物技术有限公司,中国北京),对处于不同休眠阶段的梨花芽 *miR159* 和靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达模式进行分析,以 5S rRNA<sup>[20]</sup>和 *PpActin*<sup>[21]</sup>分别作为 *miR159* 和靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的内参对其表达量进行校正,引物具体信息见表1。下机数据采用相对定量法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )<sup>[22]</sup>计算其相对表达量。

### 1.3 数据处理和分析

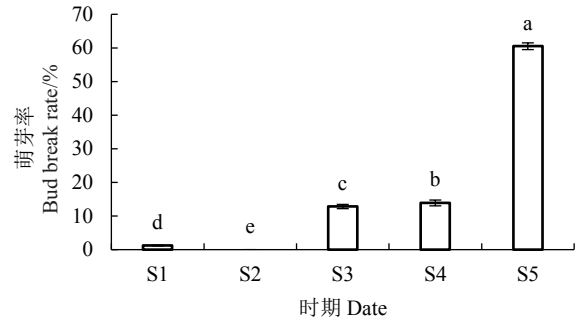
萌芽率(%)=开花的花芽数/每组枝条总的花芽数×100。

采用 SPSS 17.0 进行数据处理及差异显著性分析,用不同的小写字母代表组间的显著性差异( $p < 0.05$ ),用 WPS、EXCEL 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 梨休眠过程中花芽萌芽率的测定以及休眠时期的判定

梨休眠过程中花芽萌芽率测定的结果见图1,根据梨枝条清水插枝的萌芽率,将采样时期 S1 定义为内休眠的初期, S2 定义为内休眠的深度休眠期, S3 定义为内休眠解除和生态休眠时期, S4 定义为生态休眠时期, S5 定义为生态休眠解除时期。



S1. 2018-11-22; S2. 2018-12-07; S3. 2018-12-22; S4. 2019-01-07; S5. 2019-01-22.

图1 黄花梨花芽在不同休眠时期萌芽率的变化

Fig. 1 The bud break rate of Huanghua pear on different dormancy date

### 2.2 基因克隆结果与序列比对

通过 PCR 扩增得到 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的基因片段。将纯化后的 PCR 产物连接 pMD<sup>TM</sup>18-T, 转化到大肠杆菌中并测序。测序结果利用 DNAMAN 软件与高通量测序结果进行比对,结果一致(图2)。

### 2.3 梨 *miR159* 家族成熟体进化树和序列比对分析

植物 *miR159* 家族成熟体进化树显示(图3), *miR159* 家族成员被分成了两大支,其中一支由柑橘的 *csi-miR159a-5p*、*csi-miR159b-5p*、*csi-miR159c-5p* 以及拟南芥的 *ath-miR159b-5p* 组成,剩下的成员则聚为另一大支。而黄花梨的 2 个 *miR159* 家族成员均处在同一个大分支上,其中 *ppy-miR159a* 与葡萄的 *vvi-miR159c*、番茄的 *sly-miR159*、甜瓜的 *cme-miR159a* 等处处在同一个小分支,而 *ppy-miR159b* 则与毛果杨的 *ptc-miR159d* 和苹果的 *mdm-miR159b* 处在同一小分支。序列比对发现, *miR159* 家族成员大多数为 20~21 nt,其中库尔勒香梨 *psi-miR159a* 的长度为 21 nt, *psi-miR159b* 的长度为 20 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。说明了黄花梨与其他物种在进化过程中高度保守。而在进化树中出现各种小分支,说明 *miR159* 家族在进化过程由于功能分化,其成熟序列也出现相应的碱基

A	<i>ppy-miR159a</i> 克隆 .seq	GGGGGTACGACGGTAGTGCCAGCTTGCATGCCTGCAGGT	40
	<i>ppy-miR159a</i> .txt	.....	0
	Consensus		
	<i>ppy-miR159a</i> 克隆 .seq	CGACGATGATCGCCCTTCTACGTCGTATCGTCATCTGACC	80
	<i>ppy-miR159a</i> .txt	.....	0
Consensus			
B	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	GTTATCGCTGCACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTGGATTG	120
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	..... TTTGGATTG	9
	Consensus	tttggattg	
	<i>ppy-miR159a</i> 克隆 .seq	AAGGGAGCTCTA CCTTCAATCCAAACATCTCTAGAGGATC	160
	<i>ppy-miR159a</i> .txt	AAGGGAGCTCTA.....	21
Consensus	aaggagctcta		
B	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	CGAAACACCCCGACCACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG	40
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	.....	0
	Consensus		
	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	ATCCTCTAGAGATCCTTGGATTGAAGGGAGCTCCCTCTTG	80
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	..... CTGGATTGAAGGGAGCTCC.....	20
Consensus	cttggattgaagggagctcc		
B	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	ATTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTGCAGCGATAACG	120
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	.....	20
	Consensus		
	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	GTCAGATGACGATACGACGTAGAAGGGCGATCATCGTCGA	160
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	.....	20
Consensus			
B	<i>ppy-miR159b</i> 克隆 .seq	CCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACA	200
	<i>ppy-miR159b</i> .txt	.....	20
Consensus			

A. *ppy-miR159a*; B. *ppy-miR159b*.

图 2 两个 *miR159* 成熟序列的对比

Fig. 2 The comparison of the sequence between two mature *miR159*

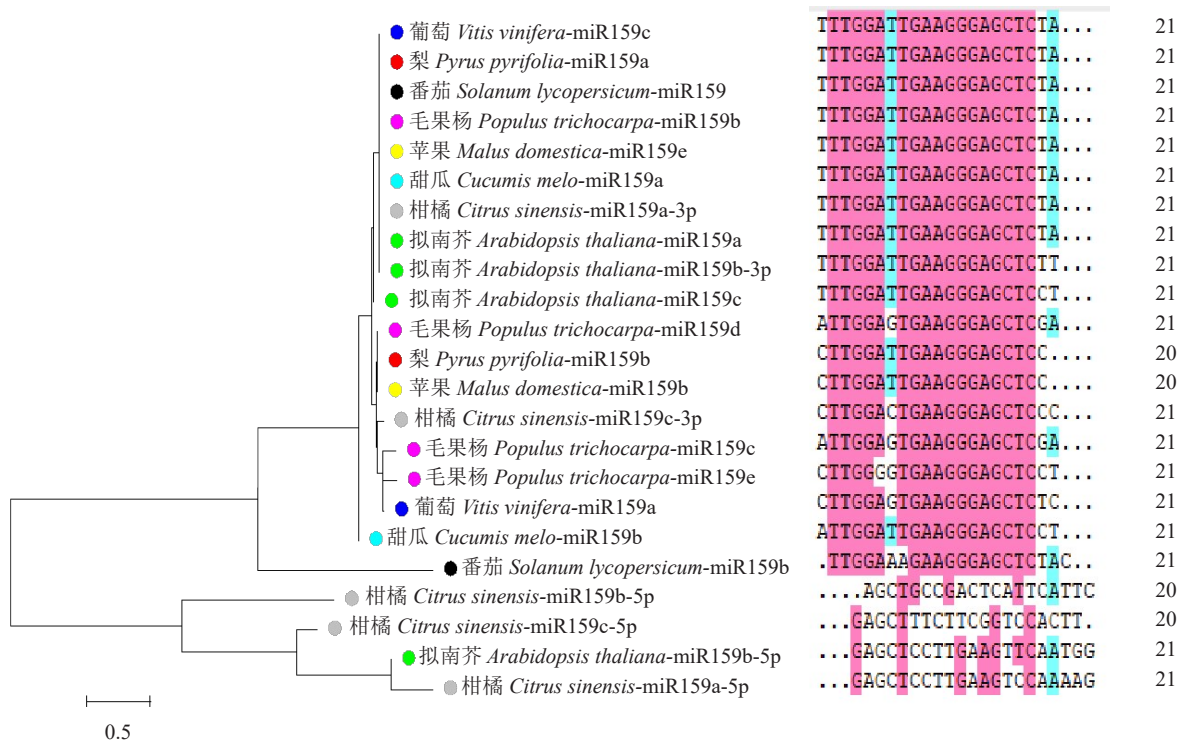


图 3 *miR159* 成熟序列的进化关系分析及序列比对

Fig. 3 The evolutionary relationship analysis and sequence alignment of mature *miR159* sequences



改变。

### 2.4 梨 miR159 家族前体二级结构和进化树分析

利用 miRDeep2 软件分析两个 miR159 前体的二级结构,得到的黄花梨 miRNA 对应前体结构见图 4。结果显示两个 miR159 前体都有完整的环状结构,其成熟体都位于环状结构的 3' 臂上。利用 RNAfold 测得 miR159 家族不同成员的最小折叠自由能( $\Delta G$ )分别为  $-368.81 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $-352.96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,说明 miR159 家族的成员结构均较为稳定。从图 5 可以看

出,不同植物的 miR159 家族的不同成员都分散在不同的分支中,说明植物 miR159 家族进化的多样性,主要可分为 2 支,黄花梨 miR159 家族成员处于不同的两个大分支。整体上,黄花梨 miR159 家族与苹果 miR159 在进化过程中关系较近。

### 2.5 梨 miR159 家族成熟序列碱基保守性分析

对这 8 种植物的 miR159 家族成员以及黄花梨的 2 个家族成员的成熟体序列进行保守性分析的结果表明(图 6-A~B),miR159 家族成熟体的保守性很强,

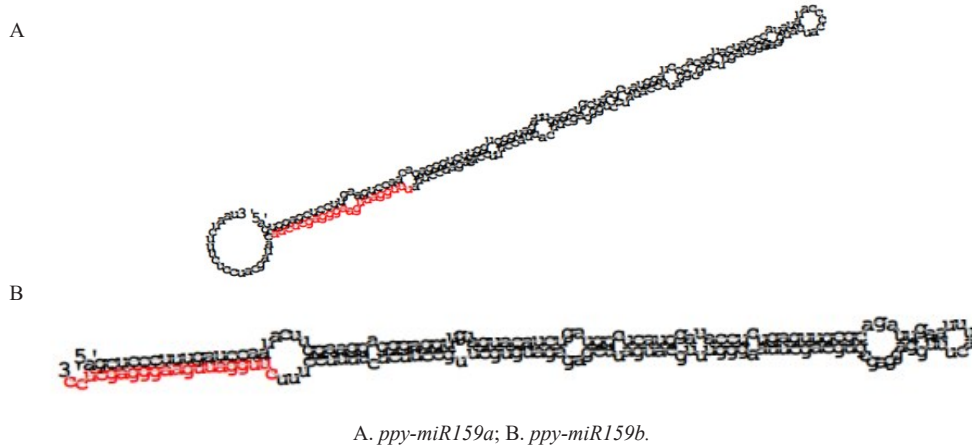


图 4 两个 miR159 的前体结构(红色部分为其对应的成熟体)

Fig. 4 The precursor structure of two miR159 (The red part is its corresponding mature body)

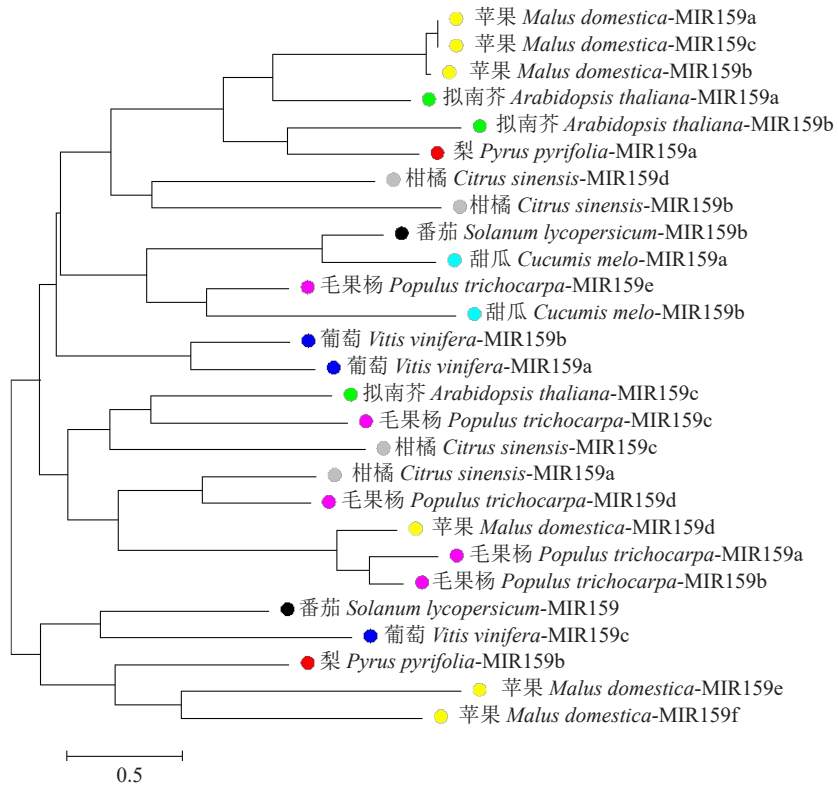
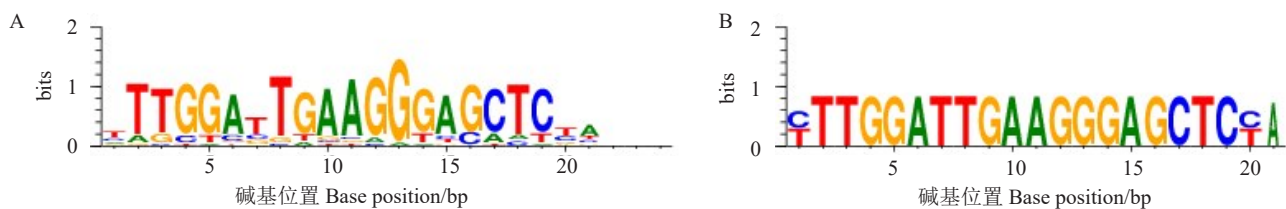


图 5 植物 miR159 的进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of miR159 sequences in plants



A. 植物 miR159; B. 黄花梨 miR159。字母大小代表在此碱基位置对应碱基类型的保守性高低。

A. Plant miR159; B. Huanghua pear miR159. The letter size represents the conservatism level of the base corresponding to this base position.

图 6 成熟序列的碱基保守性分析

Fig. 6 The analysis of base conservation of mature sequences

在 2 到 19 位碱基处的保守性较高, 且在第 13 位置处的保守性最强; 黄花梨 *miR159* 的家族成员成熟体序列的碱基保守性强, 仅在 1 和 20 位置碱基处出现变化。

## 2.6 靶基因的预测

梨 *miR159* 靶基因的预测结果见表 2, 结果显示 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的靶基因并不完全相同。 *ppy-miR159a* 的靶基因为 G 型凝集素 S 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、Ch1D 镁螯合酶亚基和 *GAMYB* 转录因子的编码基因。而 *ppy-miR159b* 的靶基因主要有细胞色素 P450 711A1、含 NAC 域蛋白

48、LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶和 *GAMYB* 转录因子的编码基因。 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的靶基因都有 *GAMYB* 转录因子的编码基因, *GAMYB* 与 GA 的调节有关, 说明梨花芽 *miR159* 的功能可能与 GA 的调控有关, 而 GA 被证实具有打破植物芽休眠的作用, GA 表达水平的提升是内休眠解除所必需的<sup>[13]</sup>。

## 2.7 黄花梨休眠过程中 *miR159* 及靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达模式分析

梨花芽休眠过程中 *miR159* 和靶基因 *py-*

表 2 候选靶基因的预测结果

Table 2 The prediction results of target genes

miRNA 名称 miRNA name	靶基因 Target gene	靶基因功能注释 Target gene annotation
<i>ppy-miR159a</i>	<i>pyrus_GLEAN_10017135</i>	G 型凝集素 S 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase
	<i>pyrus_GLEAN_10012258</i>	Ch1D 镁螯合酶亚基 Magnesium-chelatase subunit Ch1D
	<i>pyrus_GLEAN_10017102</i>	G 型凝集素 S 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase
	<i>pyrus_GLEAN_10037391</i>	<i>GAMYB</i> 转录因子 Transcription factor <i>GAMYB</i>
	<i>pyrus_GLEAN_10035941</i>	<i>GAMYB</i> 转录因子 Transcription factor <i>GAMYB</i>
<i>ppy-miR159b</i>	<i>pyrus_GLEAN_10009376</i>	细胞色素 P450 711A1 Cytochrome P450 711A1
	<i>pyrus_GLEAN_10042310</i>	含 NAC 域蛋白 48 NAC domain-containing protein 48
	<i>pyrus_GLEAN_10035941</i>	<i>GAMYB</i> 转录因子 Transcription factor <i>GAMYB</i>
	<i>pyrus_GLEAN_10006566</i>	<i>GAMYB</i> 转录因子 Transcription factor <i>GAMYB</i>
	<i>pyrus_GLEAN_10024305</i>	可能的 LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase

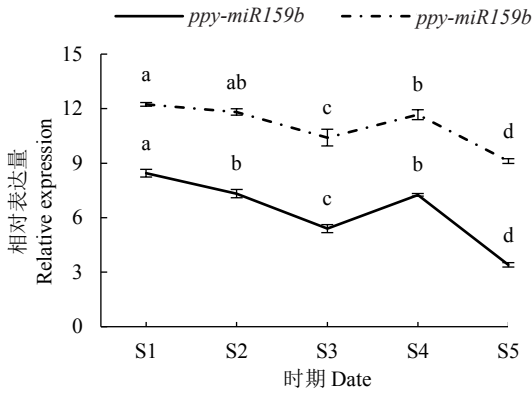
*rus\_GLEAN\_10035941* 的表达情况见图 7 和图 8。结果显示, 梨花芽休眠过程中 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的表达量呈先下降后上升再下降的双峰变化趋势, 总体呈下降趋势, 而且在 S3 和 S5 阶段的表达量出现明显降低; 靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 在休眠期间的表达量呈先上升后下降再上升的变化趋势, 总体呈上升趋势, 与 *miR159* 呈负相关表达, 而且在 S3 和 S5 阶段的表达量出现明显上升。其中 S3 是在内休眠解除阶段, S5 是在生态休眠解除阶段, 说明 *miR159* 可能通过调节与 *GAMYB*

有关的靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达起到调控梨花芽休眠进程的作用。

## 2.8 梨休眠花芽经 HC 破眠处理后 *miR159* 和靶基因的表达模式分析

梨休眠花芽采用 HC 破眠处理后的萌芽率为 93.05% (表 3), 对照组的萌芽率为 10.48%, 显示 HC 处理能促进梨花芽解除休眠。梨休眠花芽经 HC 破眠处理后 *miR159* 和靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达结果见图 9, 结果显示 HC 处理后, 梨花芽 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 的表达量显著下降, 而

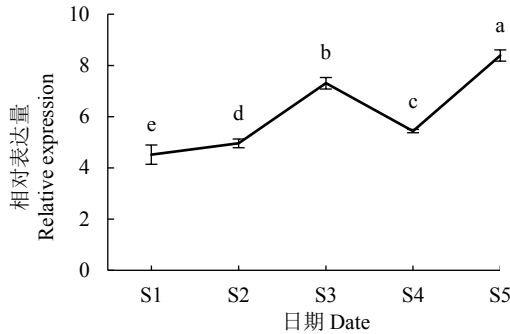




S1. 2018-11-22; S2. 2018-12-07; S3. 2018-12-22; S4. 2019-01-07; S5. 2019-01-22.

图 7 梨花芽休眠期间 miR159 的表达

Fig. 7 The relative expression of miR159



S1. 2018-11-22; S2. 2018-12-07; S3. 2018-12-22; S4. 2019-01-07; S5. 2019-01-22.

图 8 梨花芽休眠期间 pyrus\_GLEAN\_10035941 的表达

Fig. 8 The relative expression of candidate target gene

pyrus\_GLEAN\_10035941

表 3 梨休眠花芽采用 HC 破眠处理后的萌芽率

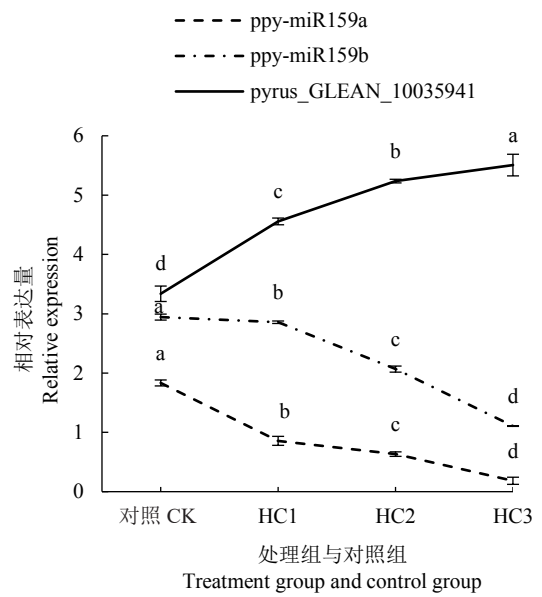
Table 3 Bud break rate statistics

处理 Treatment	萌芽率 Bud break rate/%
对照 CK	10.48
HC	93.05

靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 的表达量显著上升,说明 *miR159* 可能在梨花芽休眠解除阶段通过调控与 *GAMYB* 相关的靶基因参与芽休眠的进程。

### 3 讨论

*miR159* 在植物的生长发育过程中发挥了重要的作用。拟南芥的主根生长与 *miR159* 所介导的靶基因有关, *miR159* 靶基因可以抑制主根的生长<sup>[23]</sup>。 *miR159* 通过 *MYB33* 参与拟南芥叶片发育,过表达 *miR159* 的靶基因 *MYB33*,会导致叶片变小,叶柄变



CK. 对照组; HC1. HC 处理 12 h; HC2. HC 处理 72 h; HC3. HC 处理 216 h.

CK. Control group; HC1. HC processing for 12 hours; HC2. HC processing for 72 hours; HC3. HC processing for 216 hours.

图 9 梨休眠花芽经 HC 破眠处理后 miR159 和靶基因表达模式

Fig. 9 The expression analysis of miR159 members and their target genes in pear dormant flower buds after HC treatment

短<sup>[24]</sup>。 *miR159* 在植物花发育过程中有着重要的作用<sup>[25]</sup>。在观赏海棠中, *miR159* 对花色苷的合成具有正调控作用<sup>[26]</sup>。白菜中过表达 *miR159a* 会影响花粉的发育,进而导致花粉败育<sup>[27]</sup>。过表达 *miR159a* 会导致拟南芥植株的雄蕊发育不全、育性降低<sup>[28]</sup>。 *miR159* 可以调控植物的开花时间。拟南芥在短日照的条件下, *miR159* 过表达会导致开花延迟<sup>[29]</sup>。而在山核桃中 *cca-miR159.2* 可以使植株提早开花并使叶片减少<sup>[30]</sup>。 *miR159* 和靶基因通过 GA 参与葡萄的开花过程<sup>[31]</sup>,并以不同的 GA 应答模式参与调控葡萄果皮与果肉的发育<sup>[32]</sup>。 *miR159* 在植物逆境胁迫中也发挥了重要作用,比如低磷胁迫<sup>[33]</sup>和干旱胁迫<sup>[34]</sup>等。 *miR159* 在果树中的功能研究,尤其是调控休眠作用的机制还有待于进一步阐明。本文从黄花梨中克隆得到 *miR159* 两个成熟体和两个前体序列,分别命名为 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b*、*ppy-MIR159a* 和 *ppy-MIR159b*。对成熟体的保守性分析发现, *miR159* 家族在梨和其他物种中具有较强的保守性。黄花梨 *miR159* 家族前体具有典型的茎环二级

结构,成熟体在3'端,最小折叠自由能小,结构稳定。黄花梨 *miR159* 家族与苹果和毛果杨的亲缘关系比较近,前体序列进化树具有许多小分支,具有一定多样性,说明 *miR159* 家族是一类在不同植物中具有高度保守性,但又存在多样性的家族基因。黄花梨2个 *miR159* 成员的靶基因,都靶向 *GAMYB* 基因,这与前人的研究结果一致<sup>[35-36]</sup>,还靶向其他功能不同的基因,进一步说明 *miR159* 的进化多样性。

*miR159* 是已经被证实的8个高度保守的 miRNA 之一,在 GA 信号途径中起到重要的调控作用<sup>[37]</sup>。GA 在植物整个生命过程中调节生长发育的各个环节,如种子萌发、芽休眠、花芽分化、茎叶伸长和器官发育等<sup>[38]</sup>。拟南芥中已经验证了20多个受 *miR159* 调控的靶基因,主要为 *MYB* 基因,而且绝大多数属于 *GAMYB* 家族<sup>[28]</sup>。*GAMYB* 是受 GA 诱导的 MYB 类转录因子,是 GA 信号途径中关键的基因,植物表达出的 *miR159* 与 *GAMYB* 的结合位点相结合,降解 *GAMYB* 基因,从而抑制 *GAMYB* 基因的表达<sup>[12]</sup>。在野生型水稻中,*GAMYB* 基因和 *miR159* 呈负相关表达,并且过表达 *miR159* 使 *GAMYB* 的表达量下降<sup>[35]</sup>。而且,在 GA 调控植物开花的过程中 *miR159* 发挥重要作用,调控机制为转录后调控<sup>[16]</sup>。DELLA 蛋白是 GA 响应的负调控因子<sup>[39]</sup>,GA 通过增强阻遏物 DELLA 蛋白的降解,促进发芽<sup>[40]</sup>和植物生长<sup>[41]</sup>。GA 有打破植物芽休眠的作用,Fumio 等<sup>[13]</sup>认为 GA 表达水平的提升是内休眠解除所必需的。笔者课题组的研究表明,GA 的含量在休眠过程中发生明显变化,在休眠解除临界期明显上升,且当含量升高到一定程度时休眠解除,说明 GA 可以打破梨芽休眠进而调控梨芽休眠进程<sup>[18]</sup>。而且,DELLA 基因在梨芽内休眠解除时期出现明显上调表达,花芽萌动时表达量达到最大,外源喷施 GA 处理梨休眠花芽,试验组 *DELLA* 基因的表达量显著高于对照组,说明 GA 通过作用于 DELLA 蛋白来促进休眠解除<sup>[42]</sup>。本文的结果表明, *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 在梨芽内休眠解除和生态休眠解除时期出现明显下调表达,靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 则显著上调表达。有趣的是,靶基因 *pyrus\_GLEAN\_10035941* 和 *DELLA* 基因的表达模式类似,并且都与 *miR159* 表达趋势相反,与 GA 信号有关, *pyrus\_GLEAN\_10035941* 和 *DELLA* 基因之间是否存在竞争关系? *miR159* 是否也对 *DELLA* 基因有

调控作用呢? 这些都有待后续试验进一步说明。HC 破眠处理的结果也表明,随着破眠处理时间增加, *miR159* 表达量明显降低,而靶基因表达量明显增加。梨花芽休眠进程中, *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b* 表达量逐步下降,可能削弱了对 *GAMYB* 的降解作用,使 *GAMYB* 表达量增加,促进 GA 信号产生,提高梨花芽对 GA 的响应,从而促进梨花芽休眠的解除,但 *miR159* 通过调控 GA 信号途径参与调控梨花芽休眠进程的机制还需要进一步的研究验证。

## 4 结 论

本文从实验室前期构建的砂梨(黄花)miRNA 文库中筛选鉴定出2个 *miR159* 成熟体和2个前体序列,分别为 *ppy-miR159a* 和 *ppy-miR159b*、*ppy-MIR159a* 和 *ppy-MIR159b*。梨 *miR159* 调控的潜在靶基因主要是 *MYB* 家族基因,它与 GA 的调控有关,另外还包括蛋白激酶、细胞色素等功能不同的蛋白基因。梨花芽可能通过下调 *miR159* 表达,促进 *GAMYB* 表达,提高 GA 含量,促进梨花芽冬季休眠的解除。

## 参考文献 References:

- [1] 张绍铃,谢智华. 我国梨产业发展现状、趋势、存在问题与对策建议[J]. 果树学报, 2019, 36(8): 1067-1072.  
ZHANG Shaoling, XIE Zhihua. Current status, trends, main problems and the suggestions on development of pear industry in China[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(8): 1067-1072.
- [2] LI L, LIU J H, LIANG Q, ZHANG Y H, KANG K Q, WANG W T, FENG Y, WU S H, YANG C, LI Y Y. Genome-wide analysis of long noncoding RNAs affecting floral bud dormancy in pears in response to cold stress[J]. Tree Physiology, 2021, 41(5): 771-790.
- [3] LI L, LIU J H, LIANG Q, FENG Y, WANG C, WU S H, YANG C, LI Y Y. Downregulation of lncRNA *PpL-T31511* and *Pp-miRn182* promotes hydrogen cyanamide-induced endodormancy release through the PP2C-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pathway in pear (*Pyrus pyrifolia*) [J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11842. Doi: 10.3390/ijms222111842.
- [4] 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.
- [5] LLAVE C, KASSCHAU K D, RECTOR M A, CARRINGTON J C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants[J]. The Plant Cell, 2002, 14(7): 1605-1619.
- [6] JAE-HOON J, PIL J S, CHUNG-MO P. MicroRNA biogenesis and function in higher plants[J]. Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(2): 111-126.
- [7] MA J Y, ZHAO P, LIU S B, YANG Q, GUO H H. The Control

- of developmental phase transitions by microRNAs and their targets in seed plants[J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 1971. DOI: 10.3390/ijms21061971.
- [8] MIAO C B, WANG Z, ZHANG L, YAO J J, HUA K, LIU X, SHI H Z, ZHU J K. The grain yield modulator miR156 regulates seed dormancy through the gibberellin pathway in rice[J/OL]. Nature Communications, 2019, 10(1): 3822. DOI: 10.1038/s41467-019-11830-5.
- [9] DING Q, ZENG J, HE X Q. MiR169 and its target *PagHAP2-6* regulated by ABA are involved in poplar cambium dormancy[J]. Journal of Plant Physiology, 2016, 198: 1-9.
- [10] GAO J, NI X P, LI H T, HAYAT F, SHI T, GAO Z H. MiR169 and PmRGL2 synergistically regulate the NF-Y complex to activate dormancy release in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)[J]. Plant Molecular Biology, 2021, 105(1): 83-97.
- [11] ZHANG Y X, WANG Y Y, GAO X K, LIU C Y, GAI S P. Identification and characterization of microRNAs in tree peony during chilling induced dormancy release by high-throughput sequencing[J/OL]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4537. DOI: 10.1038/s41598-018-22415-5.
- [12] ACHARD P, HERR A, BAULCOMBE D C, HARBERD N P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA[J]. Development, 2004, 131(14): 3357-3365.
- [13] FUMIO T, KENJI T, KIYOSHI B. Effect of chilling treatment on intensity of bud dormancy, respiration and endogenous growth regulators in Japanese pear 'Nijisseiki'[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1992, 60(4): 763-769.
- [14] PÄIVI L H R, ANNIKKI W, JORMA V, LINDA R, RAILI R, JAAKKO K, CHRISTIAAN V D S. Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits GA-Inducible 1,3- $\beta$ -Glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*[J]. The Plant Cell, 2011, 23(1): 130-146.
- [15] 毕磊. 梨休眠特性及解除休眠的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- BI Lei. Studies on dormant characteristic and releases from dormancy of pear[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2006.
- [16] LI Y J, ALONSO-PERAL M, WONG G, WANG M B, MILLAR A A. Ubiquitous miR159 repression of *MYB33/65* in *Arabidopsis rosettes* is robust and is not perturbed by a wide range of stresses[J/OL]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 179. DOI: 10.1186/s12870-016-0867-4.
- [17] 马鑫瑞, 李亮, 刘瑾航, 杨梦洁, 陈洁, 梁沁, 吴少华, 李永裕. 梨花芽休眠相关 miRNA 的鉴定和差异表达分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(11): 2089-2105.
- MA Xinrui, LI Liang, LIU Jinhang, YANG Mengjie, CHEN Jie, LIANG Qin, WU Shaohua, LI Yongyu. Identification and differentially expressed analysis of microRNA associated with dormancy of pear flower buds[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(11): 2089-2105.
- [18] 王会全. 南方砂梨花芽休眠进程中形态、生理及转录组分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- WANG Huiquan. Analysis of morphological, physiological, and transcriptome of dormancy process in *Pyrus pyrifolia*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture And Forestry University, 2018.
- [19] YAMANE H, OOKA T, JOTATSU H, HOSAKA Y, SASAKI R, TAO R. Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10): 3481-3488.
- [20] SHI R, CHIANG V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. Biotechniques, 2005, 39(4): 519-525.
- [21] LIU G Q, LI W S, ZHENG P H, XU T, CHEN L J, LIU D F, SAYED H, TENG Y. Transcriptomic analysis of 'Suli' pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq[J/OL]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 700. www.biomedcentral.com/1471-2164/13/700.
- [22] KANTAR M, LUCAS S J, BUDAK H. MiRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress[J]. Planta, 2011, 233(3): 471-484.
- [23] XUE T, LIU Z H, DAI X H, XIANG F N. Primary root growth in *Arabidopsis thaliana* is inhibited by the *miR159* mediated repression of *MYB33*, *MYB65* and *MYB101*[J]. Plant Science, 2017, 262: 182-189.
- [24] MILLAR A A, GUBLER F. The *Arabidopsis GAMYB-like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development[J]. The Plant Cell, 2005, 17(3): 705-721.
- [25] ANTHONY A M, ALLAN L, WONG G. Biology and function of miR159 in plants[J]. Plants, 2019, 8(8): 255-255.
- [26] 康岩慧, 罗容丽, 李雨欣, 姬谦龙, 姚允聪. 观赏海棠叶片 *McmiR159a* 克隆及功能验证[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(3): 1-5.
- KANG Yanhui, LUO Rongli, LI Yuxin, JI Qianlong, YAO Yuncong. Cloning and functional verification of *McmiR159a* in *Malus leaves*[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2018, 33(3): 1-5.
- [27] HU Z W, SHEN X P, XIANG X, CAO J S. Evolution of *MIR159/319* genes in *Brassica campestris* and their function in pollen development[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 101(6): 537-550.
- [28] ALLEN R S, LI J Y, ALONSO-PERAL M M, WHITE R G, GUBLER F, MILLAR A A. MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects[J]. Silence, 2010, 1(1): 1-18.
- [29] 李巍, 徐启江. 被子植物开花时间和花器官发育的表现遗传调控研究进展[J]. 园艺学报, 2014, 41(6): 1245-1256.
- LI Wei, XU Qijiang. Epigenetic research progress on flowering time and flower organ development in angiosperms[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(6): 1245-1256.
- [30] 张博, 杨正福, Kean-Jin Lim, 舒李露, 李财运, 王正加. 山核桃 *miR159* 家族成员进化特性分析及功能研究[J]. 果树学报, 2021, 38(6): 884-894.
- ZHANG Bo, YANG Zhengfu, LIM K J, SHU Lilu, LI Caiyun, WANG Zhengjia. Evolutionary characteristic and functional research of *miR159* gene family in hickory[J]. Journal of Fruit Sci-



- ence, 2021, 38(6): 884-894.
- [31] 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.
- [32] 张文颖, 韩旭, 朱旭东, 解振强, 纠松涛, 黄雨晴, 贾海锋, 房经贵, 王晨. 葡萄 *miR159s* 靶基因的鉴定及其应答 GA 在果实不同组织的调控作用[J]. 中国农业科学, 2019, 52(16): 2858-2870.
- ZHANG Wenyang, HAN Xu, ZHU Xudong, XIE Zhenqiang, JIU Songtao, HUANG Yuqing, JIA Haifeng, FANG Jinggui, WANG Chen. Identification of the target genes of *VvmiR159s* and their regulation in response to GA in different tissues of grape berry[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(16): 2858-2870.
- [33] ZENG Q, YI Y Z, SI Q H, ZHI M Y. Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(15): 1289-1297.
- [34] MARÍA J L G, INMACULADA G R, ANA I G H, GEMMA C, BEGONYA V M, DOLORES R, CAROLINA R. Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress[J]. Plants, 2019, 8(7): 201. DOI: 10.3390/plants8070201.
- [35] TSUJI H, AYA K, UEGUCHI-TANAKA M, SHIMADA Y, NAKAZONO M, WATANABE R, NISHIZAWA N K, GOMI K, SHIMADA A, KITANO H, ASHIKARI M, MATSUOKA M. *GAMYB* controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers[J]. The Plant Journal, 2006, 47(3): 427-444.
- [36] YANG J W, ZHANG N, MI X X, WU L L, MA R, ZHU X, YAO L, JIN X, SI H J, WANG D. Identification of miR159s and their target genes and expression analysis under drought stress in potato[J]. Computational Biology and Chemistry, 2014, 53: 204-213.
- [37] ALLEN R S, LI J Y, STAHL M I, DUBROUÉ 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.
- [38] 岳川, 曾建明, 曹红利, 王新超, 章志芳. 高等植物赤霉素代谢及其信号转导通路[J]. 植物生理学报, 2012, 48(2): 118-128.
- YUE Chuan, ZENG Jianming, CAO Hongli, WANG Xinchao, ZHANG Zhifang. Gibberellins metabolism and signaling pathway in higher plant[J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(2): 118-128.
- [39] HIRANO K, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. *GID1*-mediated gibberellin signaling in plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4): 192-199.
- [40] PISKUREWICZ U, TURECKOVÁ V, LACOMBE E, LOPEZ-MOLINA L. Far-red light inhibits germination through *DELLA*-dependent stimulation of ABA synthesis and *ABI3* activity[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(15): 2259-2271.
- [41] SUN T P. Gibberellin-*GID1*-*DELLA*: A pivotal regulatory module for plant growth and development[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2): 567-570.
- [42] 刘杭, 王芳, 李亮, 王文婷, 杨贺忠, 马鑫瑞, 吴少华, 李永裕. 沙梨 *PpGAI3* 基因的分离与原核表达分析[J]. 果树学报, 2017, 34(2): 137-144.
- LIU Hang, WANG Fang, LI Liang, WANG Wenting, YANG Hezhong, MA Xinrui, WU Shaohua, LI Yongyu. Isolating and prokaryotic expression analysis of the *PpGAI3* gene in *Pyrus pyrifolia*[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(2): 137-144.

### 欢迎订阅 2023 年《河北果树》

《河北果树》是河北省果树学会主办的果树专业技术期刊, 中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、中国期刊全文数据库、中文科技期刊数据库收录期刊、河北省优秀科技期刊。主要刊登落叶果树的品种资源、栽培管理、病虫害防治、储藏加工等方面的新成果、新技术、新知识和新信息, 开设栏目有专题论述、试验研究、经验交流、百花园、工作历、广告与信息。本刊特色是通俗易懂、科学实用、技术先进、内容丰富、信息量大、可读性强、发行面广。读者对象为果树科研和推广人员、农林院校师生、各级涉农领导和广大果农。本刊国内外公开发行, 季刊, 每季首月 15 日出版, 国际标准大 16 开 64 页, 彩色四封, 每期定

价 5.00 元, 全年 4 期共 20.00 元。欢迎广大果农和果树科技工作者订阅 2023 年期刊, 同时真诚欢迎投稿。可到当地邮局(所)订阅, 邮发代号 18-247。未能从邮局订上本刊的读者, 全年都可随时直接汇款至编辑部订阅, 免费邮寄。编辑部尚有 2004-2022 年期刊可邮购。

地址: 河北省昌黎果树研究所《河北果树》编辑部

邮编: 066600

电话: 0335-2987632(兼传真)

QQ: 2567147533

E-mail: [hbgbsbjb@sohu.com](mailto:hbgbsbjb@sohu.com); [2567147533@qq.com](mailto:2567147533@qq.com)