

doi:10.7668/hbxb.2014.05.004

文冠果不同花朵类型植株 miRNA 表达差异分析

敖 妍^{1,2}, 赵磊磊³, 姜常玉⁴, 马履一^{1,2}

(1. 北京林业大学 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 国家能源非粮生物质原料研发中心, 北京 100083;
3. 内蒙古赤峰市翁牛特旗林业局, 内蒙古 赤峰 024500; 4. 北京艾比蒂生物科技有限公司, 北京 102200)

摘要:为了探索 miRNA 在文冠果不同类型植株的花发育阶段不同组织的表达特异性,以单瓣型和重瓣型文冠果的花芽、茎、叶为试材,提取这 2 种类型组织的小 RNA。从前期研究获得的文冠果小 RNA 测序数据库中筛选 11 个候选 miRNA,采用实时荧光定量 PCR 法检测其在花发育不同阶段以及茎和叶片的表达特点。结果表明,11 个候选 miRNA 具有不同的表达形式。*Xso-M007a-b*、*miR167a-b* 与 *miR169* 在两类中都是表达量随花芽发育呈现下降趋势,*Xso-M003* 则相反,说明了 miRNA 表达的时序性。在不同类型之间以及不同部位 miRNA 的表达也存在差异,*Xso-M002*、*Xso-M003*、*Xso-M007a-b*、*miR169*、*miR319* 和 *miR827* 在两类型花芽中的表达量均高于茎和叶中的表达量。对不同类型、部位和时间点上的表达情况分析,表明 miRNA 具有明显的品种特异性、组织特异性和时序性。此外,结合 miRNA 的功能与其表达量差异分析发现,文冠果的形态结构特征与 miRNA 的表达量变化密切相关。为探索 miRNA 表达量的变化在林木花器官形成与不同组织分化中的作用提供了重要信息。

关键词:文冠果;miRNA;实时荧光定量 PCR;表达分析

中图分类号:S722;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)05-0016-07

Analysis on Differential Expression of MicroRNAs in Different Types of *Xanthoceras sorbifolia*

AO Yan^{1,2}, ZHAO Lei-lei³, JIANG Chang-yu⁴, MA Lü-yi^{1,2}

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University Beijing 100083, China; 2. National Energy R&D Center for Non-food Biomass, Beijing 100083, China; 3. Forestry Bureau of Wengniute Banner, Chifeng 024500, China; 4. Beijing ABT Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102200, China)

Abstract: The aim of this paper is to explore miRNA expression specificities in different flower development stages and tissues in different types of *Xanthoceras sorbifolia*. Flower buds, stems, and leaves of single and double flower types were taken as materials. High quality small RNAs were isolated from four tissues of the two types. 11 candidate miRNAs were chosen from small RNAs data bank of *Xanthoceras sorbifolia*, and qRT-PCR was used to analyze the miRNAs expression in different flower development stages, stems and leaves. The result showed 11 miRNAs had different expression characters. The expression trends of *Xso-M007a-b*, *miR167a-b* and *miR169* were down-regulated with the flower buds development in two types; on the contrary *Xso-M003* was up-regulated. This demonstrated the sequential expression of miRNA. There was also differential expression among different types and tissues. In both types *Xso-M002*, *Xso-M003*, *Xso-M007a-b*, *miR169*, *miR319* and *miR827* showed higher expression in flower buds than in stems and leaves. Expression analysis on different types, tissues and time points proved the miRNA's expression specificities: species-specificity, tissue-specificity and time-specificity. In addition, based on miRNA function and expression difference, it was found that morphological characteristics were closely related to miRNA expression. The paper provided valuable information for exploring the function of miRNA expression variation in forest flower formation and tissues differentiation.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia*; miRNA; Real-time quantitative PCR; Expression analysis

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(BLX2012035); 国家国际科技合作专项(2014DFA31140)

作者简介: 敖妍(1981-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 讲师, 博士, 主要从事森林培育、能源植物开发利用方面的研究。

通讯作者: 马履一(1957-), 男, 云南大理人, 教授, 博士, 主要从事森林培育方面的研究。

microRNA (miRNA) 是一类内源性、长度为 21 ~ 24 nt 的非编码小 RNA, 主要在转录后水平上负向调节基因表达。miRNA 参与调控植物器官的形态建成、生长发育、激素分泌、应答外界胁迫以及信号转导等生物学过程。因此, 拓宽研究物种、系统深入研究 miRNA 意义重大。植物 miRNA 研究始于 2002 年在拟南芥中的研究^[1], 近年来已成为基因表达调控的研究热点。植物 miRNA 靶基因编码基因多参与器官发育、器官分化、细胞分裂等过程, 在花器官发育过程及开花时间调控中起重要作用^[2]。miRNA 的表达具有组织和发育时期特异性^[3]。miRNA 的定量检测技术常用 Northern blot 法、茎环引物 PCR 法、miRNA 芯片技术、polyA 聚合酶加尾法^[4]。qRT-PCR 检测基因表达灵敏度高、快捷、高效, 目前, 被广泛应用在 miRNA 表达研究中^[5-6]。

文冠果是少数适合我国北方生长的重要木本能源树种, 具有耐寒、耐旱、耐盐碱、适生区域大、易繁殖等优点。其平均种子含油率在 34% 左右, 籽油适合作为生物柴油的原料, 而且, 文冠果综合利用价值较高, 在食品、化工、医药方面都已经开发利用, 并具有较高的生态价值和观赏价值^[7]。文冠果由于花朵特征不同, 可以划分为单瓣花类型和重瓣花类型。重瓣型植株只开花不结实, 花朵的雌雄蕊全部瓣化。目前仅对重瓣型花朵的形态特征有少量报道^[8], 造成形态差异的分子机制尚不清楚。植物 miRNA 研究主要集中于模式植物上, 对文冠果 miRNA 的鉴定和表达差异分析几乎没有报道, 仅本人利用 Solexa 高通量测序及 qRT-PCR 鉴定了单瓣花和重瓣花 43 个保守 miRNA 和 10 个新 miRNA^[9]。本研究基于之前鉴定的文冠果 miRNA, 利用 qRT-PCR 方法分析 11 种 miRNA 在文冠果单瓣花、重瓣花 2 种花朵类型植株中不同发育阶段以及不同部位的表达特点, 旨在分析 miRNA 表达的品种特异性、组织特异性和时序性, 探索 miRNA 与组织器官形态分化的关系。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以文冠果单瓣花类型 (WT) 和重瓣花类型 (M) 植株为材料。单瓣型花朵花瓣 5 枚, 平展, 1 枚雌蕊, 8 枚雄蕊, 3 枚苞片, 5 枚萼片, 5 枚橙黄色角状附属体。单瓣型植株可以结实。重瓣型花朵花瓣密集, 花瓣数约 17 ~ 25 枚, 扭曲反卷, 宽窄变化较大。雌、雄蕊和角状附属体特化为花瓣。全株都为同一花型, 不能结实。2 种类型均来自单瓣型的自然杂交种子。重瓣花类型为自然突变, 且重瓣性状稳定。

每个类型选取 3 株, 花芽采集 2 次, 分别为前一年的 11 月初 (早期花芽) 和第二年春季 4 月末 (晚期花芽), 4 月同时采集幼嫩叶片、嫩茎。材料采集后迅速冻于液氮中, 然后转入 -80 °C 保存。

1.2 small RNA 提取

采用 Ambion 公司 mirVana™ miRNA Isolation Kit (AM1560) 提取试剂盒, 按照说明提取上述材料 small RNA (<200 nt)。检测取 3 μL small RNA 在 3% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 电泳条件: 1 × TAE 缓冲液, 80 V, 20 min。

1.3 small RNA 加尾

用 Ambion 公司 Poly (A) Tailing Kit, 按照说明对 small RNA 加 poly (A)。体系: 8 μL miRNA template, 5 μL 1 × PAP Buffer, 2 μL 2.5 mmol/L MnCl₂, 2 μL 10 mmol/L ATP, 0.5 μL poly (A) polymerase, 2.5 μL DEPC water。加尾后 37 °C 水浴 1 h。酚/氯仿抽提后加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 3 倍体积无水乙醇, -70 °C 过夜沉淀。将过夜后的小 RNA 离心、干燥, 并溶于 RNase-free 水中待用。

1.4 small RNA 反转录

加尾后的 small RNA 用 TIANGEN 公司 Quantscript RT Kit (Cat# KR103-03) 反转录, 反转录引物为 oligo (dT) 3'-RACE adaptor (Ambion), 5'-GCCAGC ACAGAATTAATACGACTCACTATAGG (T) 12VN-3'。反转录体系: 1 μL 10 × RT mix, 1 μL dNTP, 2.4 μL Oligo-dT, 0.5 μL Q Reverse Tran, 3.1 μL RNase-free water, 2 μL RNA。37 °C 孵育 1 h, cDNA 第一链合成完毕。以 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增, 终点法检测扩增产物的有无和大小, 判定 miRNA 的表达与否同时检测模板的完整性。反应体系组成如下: 12 μL Taq mix, 6 μL ddH₂O, 0.5 μL Forward primer, 0.5 μL Reverse primer, 1 μL cDNA。反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min, 10 °C forever。

1.5 实时定量 PCR 扩增

1.5.1 实时定量 PCR 引物设计 引物设计选择 11 个 miRNA 进行检测, 内参选用 5.8S rRNA。上游引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件进行选择 and 确认。引物设计尽可能使所有引物具有相同的 T_m 值。下游引物均为 5'-GCCAGCACAGAATTAATAC GAC-3'。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成 (表 1)。

1.5.2 实时定量 PCR 扩增 采用宝生物公司 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒, ABI 公司 7500 Fast Real-time PCR 扩增仪, 96 孔板和光学膜完成定

量 PCR 反应。以文冠果 5.8S *rRNA* 为内参。扩增体积 20 μL , 包括 1 μL cDNA 第一链稀释液, 10 μL 2 \times SYBR green reaction mix, 0.4 μL PCR forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL PCR reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL ROX Reference Dye II (50 \times), 加水补至 20 μL 体系。每个样品 3 次重复。定量 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 45 个循环。PCR 反应结束后设置相应的融解反应, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。将单瓣型早期花芽 miRNA 为对照, 设其相对晚期花表达量为 1, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各 miRNA 相对表达量的高低^[10]。

表 1 miRNA 以及 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Sequences of miRNA and primers used in qRT-PCR

miRNA	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>Xso-M002</i>	TGCCTGGCTCCCTGTATGC
<i>Xso-M003</i>	CGTATCCATCCTGAGTTTCA
<i>Xso-M007a-b</i>	CTGAAGTGTTTGGGGAACTC
<i>Xso-M008a-b</i>	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGGA
<i>miR159</i>	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTGA
<i>miR166a-g</i>	TCCGACCAGGCTTCATTCCC
<i>miR167a-b</i>	TGAAGCTGCCAGCATGATCT
<i>miR169</i>	CAGCCAAGGATGACTTGCCG
<i>miR319</i>	AGCTGCCGACTCATTCATCCA
<i>miR482</i>	TCTTCCCTATTCCACCCATGC
<i>miR827</i>	GCCTTAGATGACCATCAACAAAC
5.8S <i>rRNA</i>	ACGTCTGCCTGGGTGTACGC

1.6 miRNA 的表达差异分析

表达差异分析采用 fold-change 值计算, fold-change = M 相对表达量/WT 相对表达量。如果 fold-change > 1.5, 认为该 miRNA 是显著上调表达, 若 fold-change < 0.67, 则认为该 miRNA 是显著下调表达^[9]。

2 结果与分析

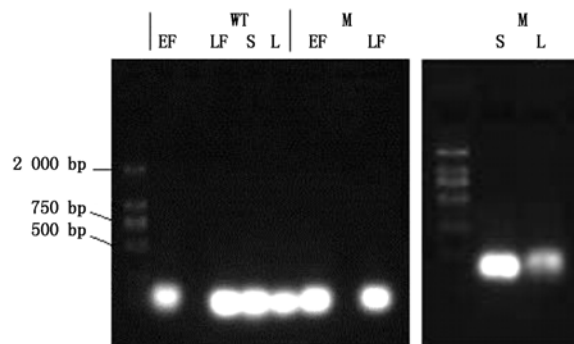
2.1 small RNA 提取

样品分别为单瓣型和重瓣型的早期花芽、晚期花芽、嫩茎和叶片。图 1 为琼脂糖凝胶电泳检测结果, 采用 2 000 bp 的 Marker, 由图 1 可见, 利用试剂盒提取的小 RNA 条带清晰, 而且都富集, 能够用于常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 等后续研究。

2.2 实时定量 PCR 扩增的均一性

以单瓣型早期花芽 small RNA 反转录成的 cDNA 为模板, 进行普通 PCR。产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳后结果如图 2。以 5.8S *rRNA* 引物的产物为对照, 产物中有 11 个(7 个保守 miRNA 和 4 个 novel miRNA) 均一性表达, 只有一条明显的条带, 片段大约都在 64 bp 左右, 为验证 miRNA 在不同的组织和发育时期表达量的变化, 选择这些引物进行 qRT-

PCR 分析。



WT. 单瓣型; M. 重瓣型; EF. 早期花芽; LF. 晚期花芽; S. 茎; L. 叶。表 2, 3、图 3 同。

WT. Single flower type; M. Double flower type; EF. Early stage of flower development; LF. later stage of flower development; S. Stem; L. Leaf. The same as Tab. 2, 3 and Fig. 3.

图 1 两种类型文冠果各组织提取的小 RNA 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of small RNA extracted from different tissues of two types of *X. sorbifolia*

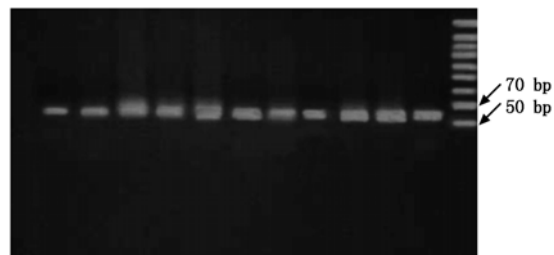


图 2 普通 PCR 验证文冠果 miRNA 表达

Fig.2 PCR validation of miRNA expressions in *X. sorbifolia*

每样品每基因均采用 3 孔平行试验, 且每板均设置内参, 得出 3 个 CT 值并进行方差分析, 标准偏差均小于 0.3 (表 2), 说明定量 PCR 反应具有较强的准确性和可重复性。荧光定量 PCR 过程产生的溶解曲线, 曲线均为单一峰, 无其他杂峰, 表明 cDNA 扩增产物非常专一, 特异性较高, 结果可用于后续分析。

2.3 不同类型文冠果不同组织的 miRNA 表达分析

从前期研究获得的文冠果小 RNA 测序数据库中筛选 *Xso-M002*、*Xso-M003*、*Xso-M007a-b*、*Xso-M008a-b*、*miR159*、*miR166a-f*、*miR167a-b*、*miR169*、*miR319*、*miR482*、*miR827* 共 11 个序列的 miRNA^[9], 分析这些 miRNA 在文冠果 2 个类型, 每个类型 4 个不同组织中的表达差异, 其相对表达量见图 3。结果表明, 在 2 种类型的 4 个组织中均检测到了 11 个 miRNA 序列的表达, 只是 *miR159* 在单瓣型花芽和茎的表达量相对较低, 图中不明显。

在 2 种类型之间 miRNA 表达差异比较中, 各 miRNA 在不同组织的表达差异采用 fold-change 计算, 即重瓣型相对表达量与单瓣型相对表达量的比值, 比较结果见表 3。

表 2 不同类型和组织文冠果各基因实时定量 PCR 反应 CT 值

Tab. 2 CT value of real-time PCR reaction of genes in different types and tissues of *X. sorbifolia*

基因 Gene	类型 Type	组织 Tissue	CT			平均值 Mean	标准差 SD
			重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3		
<i>miR159</i>	单瓣型 WT	EF	25.93	26.18	25.90	26.00	0.15
		LF	29.25	28.96	28.87	29.02	0.20
		S	26.63	26.90	26.78	26.77	0.19
		L	19.85	19.97	19.99	19.94	0.08
	重瓣型 M	EF	21.35	21.33	21.45	21.38	0.06
		LF	22.23	22.26	22.33	22.27	0.05
		S	21.20	21.05	20.98	21.08	0.11
		L	21.63	21.52	21.67	21.60	0.08
<i>miR166a-f</i>	单瓣型 WT	EF	24.56	24.81	24.63	24.67	0.13
		LF	28.47	28.38	28.32	28.39	0.08
		S	25.63	25.93	26.21	25.92	0.29
		L	24.82	24.85	24.89	24.85	0.04
	重瓣型 M	EF	23.74	23.67	23.87	23.76	0.10
		LF	25.86	25.88	25.93	25.89	0.04
		S	27.40	27.40	27.42	27.41	0.02
		L	25.97	25.95	26.08	26.00	0.07
<i>miR169</i>	单瓣型 WT	EF	27.86	27.93	27.89	27.90	0.04
		LF	31.34	31.56	31.71	31.53	0.19
		S	30.11	30.35	30.24	30.23	0.12
		L	29.38	29.34	29.22	29.31	0.09
	重瓣型 M	EF	26.53	26.70	26.49	26.57	0.11
		LF	29.61	29.66	29.62	29.63	0.02
		S	31.17	31.17	30.96	31.10	0.12
		L	29.63	29.41	29.39	29.48	0.13
<i>miR319</i>	单瓣型 WT	EF	28.43	28.33	28.51	28.43	0.09
		LF	29.81	29.88	29.49	29.72	0.21
		S	29.81	29.53	29.37	29.57	0.22
		L	29.57	29.74	29.58	29.63	0.10
	重瓣型 M	EF	27.00	26.98	26.94	26.97	0.03
		LF	29.01	29.00	28.94	28.98	0.04
		S	29.40	29.37	29.43	29.40	0.03
		L	29.68	29.34	29.66	29.56	0.19

注：只列出部分数据。
Note: A part of data was given.

2.3.1 花发育不同时期 miRNA 的表达差异 由图 3 可见,同一类型随着发育不同时期 miRNA 的表达发生着变化。在单瓣型花芽中,与早期相比,发育晚期 *Xso-M003* 及 *miR319* 表现出上调表达,其余 miRNA 则下调表达。在重瓣型中,随着花芽发育,*Xso-M007a-b*、*miR319*、*miR167a-b* 及 *miR169* 表现出下调表达,其余 miRNA 则上调表达。综合分析 2 种类型,*Xso-M007a-b*、*miR167a-b* 与 *miR169* 在两类中都是表达量随花芽发育呈现下降趋势。*Xso-M003* 在两类中都是随着发育进行表达量呈现上升趋势。

由图 3 和表 3 可见,在 2 种类型之间,花芽发育不同时期 miRNA 的表达也存在差异。在发育早期

的花芽中 (EF),和单瓣型相比,*miR167*、*miR169*、*miR319*、*miR482*、*Xso-M003*、*miR159* 在重瓣型表现上调表达,其中 *Xso-M003*、*miR159* 达显著水平。*Xso-M002*、*Xso-M007a-b*、*miR827*、*Xso-M008a-b*、*miR166* 在重瓣型表现出下调表达,其中 *Xso-M008a-b*、*miR166* 在重瓣型的表达量显著低于单瓣型。在发育晚期的花芽中 (LF),和单瓣型相比,只有 *Xso-M007a-b* 在重瓣型中下调表达,其余都是在重瓣型中上调表达,并且 *Xso-M002*、*Xso-M003*、*Xso-M008a-b*、*miR159*、*miR166*、*miR167*、*miR169*、*miR482* 在重瓣型的表达量显著高于单瓣型。综合分析 2 种类型,*Xso-M003*、*miR159*、*miR167a-b*、*miR169*、*miR319*、

miR482 不论花芽发育早期还是晚期,都是重瓣型高于单瓣型。*Xso-M007a-b* 都是单瓣型高于重瓣型。

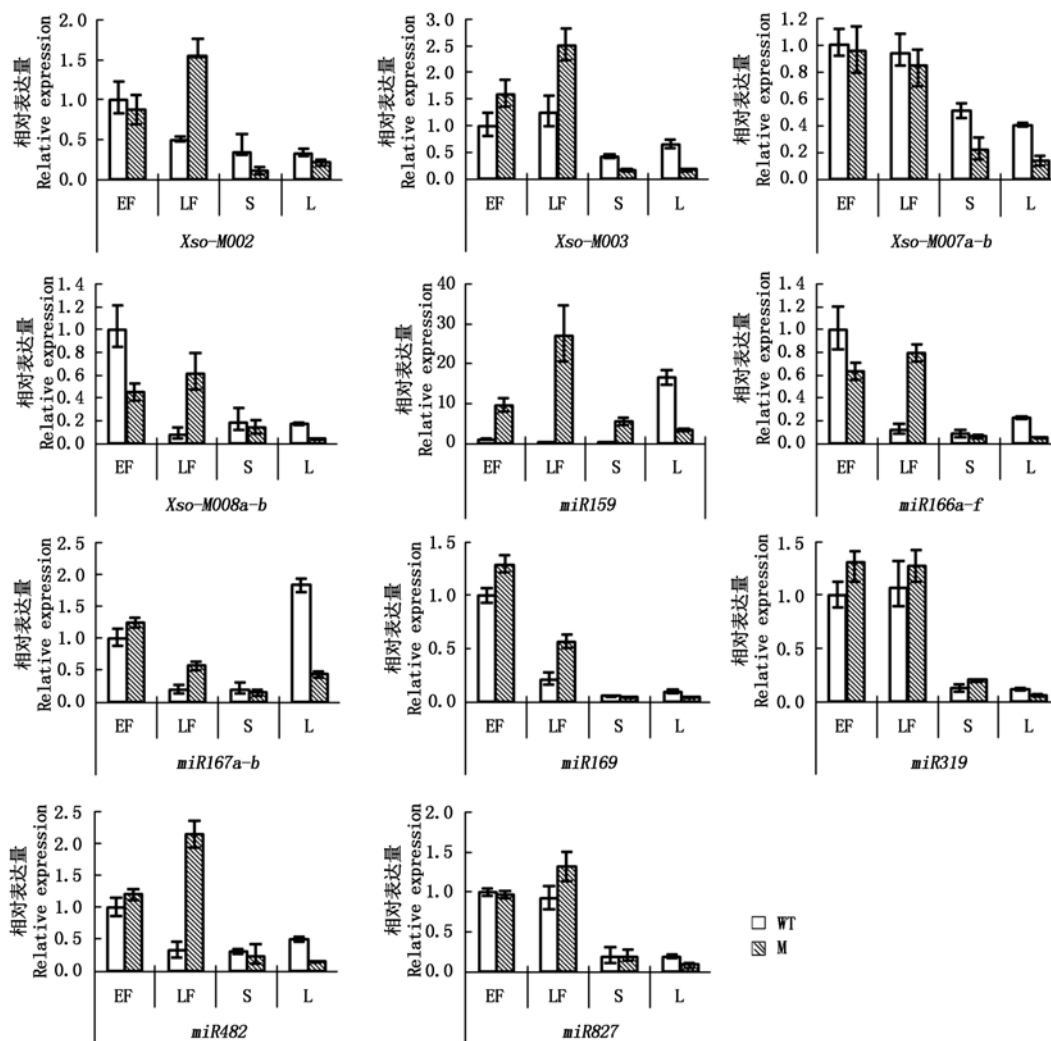


图3 单瓣型与重瓣型中 miRNA 表达差异情况

Fig.3 Different expression of miRNA in single flower type and double flower type

表3 两种类型间各组织 miRNA 表达差异分析

Tab.3 Variance analysis of miRNA expression in different tissues of two types

miRNA	不同组织 fold-change 值			
	Fold-change value in different tissues			
	EF	LF	S	L
<i>Xso-M002</i>	0.86	3.17 ↑	0.30 ↓	0.62 ↓
<i>Xso-M003</i>	1.59 ↑	2.01 ↑	0.35 ↓	0.26 ↓
<i>Xso-M007a-b</i>	0.95	0.90	0.42 ↓	0.34 ↓
<i>Xso-M008a-b</i>	0.44 ↓	7.96 ↑	0.70	0.23 ↓
<i>miR159</i>	9.48 ↑	135.10 ↑	31.32 ↑	0.20 ↓
<i>miR166</i>	0.63	6.66 ↑	0.70	0.21 ↓
<i>miR167</i>	1.25	2.91 ↑	0.71	0.23 ↓
<i>miR169</i>	1.28	2.65 ↑	0.79	0.41 ↓
<i>miR319</i>	1.31	1.19	1.62 ↑	0.48 ↓
<i>miR482</i>	1.19	6.70 ↑	0.75	0.28 ↓
<i>miR827</i>	0.96	1.41	1.03	0.44 ↓

注: ↑. 显著上调表达; ↓. 显著下调表达。

Note: ↑. The miRNA was significantly up-regulated; ↓. The miRNA was significantly down-regulated.

2.3.2 miRNA 在各组织中的表达差异 由2种类型的 miRNA 在早期花芽、晚期花芽、嫩茎和叶片中

表达变化(图3)可以看出, *Xso-M002*、*Xso-M003*、*Xso-M007a-b*、*miR169*、*miR319*、*miR827* 共6个序列在2个类型花芽中的表达量均高于在嫩茎和叶片中的表达量,推测这些 miRNA 可能参与花的分化发育调控。分析表明,单瓣型的 *miR159* 在叶片中表达量(16.50)显著高于花芽和茎等。单瓣型的 *miR167a-b* 也是在叶片中表达量高于其他组织。在2个类型的4个组织中表达量变化趋势一致的只有 *Xso-M007a-b* (EF > LF > S > L) 与 *Xso-M003* (LF > EF > L > S)。其余 miRNA 的表达量变化比较多样化,充分验证了 miRNA 在不同组织器官表达存在差异。

由图3和表3可以看出, *Xso-M007a-b*、*miR827* 在4个组织中都是重瓣型的表达量低于单瓣型,并且 *Xso-M007a-b* 在嫩茎和叶片中显著下调, *miR827* 在叶片中显著下调。 *miR159* 在早期花芽、晚期花芽、嫩茎中都是重瓣型的表达量显著高于单瓣型,在叶片中则显著下调表达。另外,和单瓣型相比,这些

miRNA 在重瓣型叶片中全部表现为显著下调表达。

3 结论与讨论

目前,miRNA 对性状形成的调控机制已为成植物学领域专家关心的热点和前沿之一。本研究通过对 11 个候选 miRNA 在不同类型文冠果的不同阶段花芽、茎、叶差异表达分析,初步发现其表达的时空特异性。

在花芽发育不同阶段表达的差异,说明它在植物体内的出现可能受时间阶段的诱导。*Xso-M007a-b*、*miR167a-b* 与 *miR169* 在两类中都是表达量随花芽发育呈现下降趋势,*Xso-M003* 在两类中都是随着发育表达量呈现上升趋势,说明了 miRNA 表达的时序性。有趣的是,在这一过程中花发育的形态特征也在发生变化。

此外,在不同类型之间以及不同部位 miRNA 的表达也存在差异,体现了 miRNA 表达的品种特异性和部位特异性。例如单瓣型的 *miR159*、*miR167a-b* 都是在叶片中表达量高于其他组织。对于在一些特定组织高表达的 miRNA,也许这些 miRNA 具有特定功能,或者参与特定组织的形态建成。*Xso-M002*、*Xso-M003*、*Xso-M007a-b*、*miR169*、*miR319* 和 *miR827* 在两类型花芽中的表达量均高于在茎和叶中的表达量,暗示了这些 miRNA 可能与花器官的分化和发育有关。值得注意的是,在本研究中,一些在文献报道中与花器官分化有关的 miRNA^[11-13] 也被检测到在 2 种类型之间存在表达量差异,有些还达到显著水平。

之前研究表明:*miR159* 通过结合 MYB 类因子发挥其在花发育方面的作用。*miR159* 家族是拟南芥中含量最丰富的 miRNA^[14-16]。*miR159* 过表达植株的雄蕊发育不全,育性降低。*miR159a/miR159b* 双突变体植株矮化,顶端优势降低,育性降低,种子形状不规则。*miR159c* 可能是谷类作物花药发育的重要调控因子;本研究中 *miR159* 在重瓣型花芽中表达量显著上调,而且重瓣花的雌雄蕊发生瓣化,完全不结实,育性降低。

在本研究中 *miR166* 在花芽发育晚期(LF)表现出重瓣型中显著上调表达。据报道,*miR166* 在分生组织活动调控方面与花器官中分生组织的形成密切相关。在 *miR166* 过表达的突变体中,花结构被严重地破坏,突变体的雌蕊群很小,心皮数量也减少^[13,17]。这些特征都与文冠果重瓣花的结构特征一致。但是在花芽发育早期(EF)表现出重瓣型中显著下调表达。这说明 *miR166* 的表达存在时序

性,在重瓣型中随着花芽发育的进行,其表达量逐渐增加。

miR167 调控开花植物的繁殖能力(包括雄蕊的可育性)。拟南芥生长素反应因子 ARF6 和 ARF8 调控雌,雄蕊的初始阶段的发育,过表达 *miR167* 的表型与 ARF6 和 ARF8 双突变体类似,心皮停止发育,花粉囊发育不正常,雄蕊花丝变短,不能释放花药,胚珠等的成熟度降低,雌性不育^[12,18]。本研究在花芽发育过程中 *miR167* 在重瓣型中都表现出上调表达,而且在花芽发育后期还呈现显著上调,结合重瓣型的花器官特点,其表达量变化趋势进一步验证了 *miR167* 在花器官分化和发育过程中的功能。

根据花发育的“ABCDE”模型^[19],C 功能基因参与调控雄蕊,心皮和胚珠的发育。C 功能基因抑制 A 功能基因在第 3 雄蕊,4 轮心皮花器官中表达。*miR169* 影响花器官分化^[20],抑制金鱼草和矮牵牛花被中 C 功能基因的活性,导致雄蕊退化。本研究中重瓣型 *miR169* 表现出上调表达,而且在花芽发育后期达到显著上调,结合文献研究其功能,表达量变化趋势与重瓣型花的育性特征一致。

Nag 等^[11]研究表明,*miR319* 过表达会引起一些发育障碍,如花期延迟,雄蕊败育。*miR319a-c* 基因主要在花发育晚期花序的特定部位表达,*miR319a* 在调控花器官的大小和形状方面也发挥关键作用。时空表达模式分析表明,*miR319a* 在发育早中期的花瓣和雄蕊中高丰度表达。在本研究中,重瓣型花芽的 *miR319* 上调表达,这也许与其育性缺陷有关。

Xso-M003 在花芽中的表达显著上调,而在茎和叶片中则显著下调,其功能还有待进一步探究。据文献报道,*miR827* 受磷缺乏诱导^[21],本研究中它在 2 种类型花芽发育后期表达差异变大,这个时期正是雌蕊分化的阶段,反映出 miRNA 可能具有多重作用,也许它们对花器官的形成及发育过程同样有影响。另外,在不同植物之间 miRNA 的功能可能有所不同,且 miRNA 表达组织,品种特异性和时序性上应该具有更精细的表现。

参考文献:

- [1] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants [J]. Genes and Development, 2002, 16(13): 1616 - 1626.
- [2] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 19 - 53.
- [3] Chen X M. MicroRNA biogenesis and function in plants [J]. FEBS Letters, 2005, 579(26, SI): 5923 - 5931.

- [4] 陈新, 曾长英, 卢诚, 等. 基于 PCR 技术的 miRNA 定量检测方法[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(11): 88–93.
- [5] 魏志刚, 钱婷婷, 张凯旋, 等. 外源 GA₃ 对白桦成花基因影响的定量 PCR 分析[J]. 林业科学, 2011, 47(7): 187–192.
- [6] 杨帆, 丁菲, 杜天真. 盐胁迫下构树 DREB 转录因子基因表达的实时荧光定量 PCR 分析[J]. 林业科学, 2010, 46(4): 146–150.
- [7] 敖妍, 段劼, 于海燕, 等. 文冠果研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(6): 197–203.
- [8] 彭伟秀, 李凤兰, 王保柱. 文冠果同源异型变异株的发现[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(5): 92–94.
- [9] Ao Y, Wang Y W, Chen L, *et al.* Identification and comparative profiling of microRNAs in wild-type *Xanthoceras sorbifolia* and its double flower mutant[J]. *Genes & Genomics*, 2012, 34(5): 561–568.
- [10] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519–525.
- [11] Nag A, King S, Jack T. miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2009, 106(52): 22534–22539.
- [12] Nagpal P, Ellis C M, Weber H, *et al.* Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation [J]. *Development*, 2005, 132(18): 4107–4118.
- [13] Rubio-Somoza I, Weigel D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants [J]. *Trends Plant Science*, 2011, 16(5): 258–264.
- [14] Kasschau K D, Fahlgren N, Chapman E J, *et al.* Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs [J]. *PLOS Biology*, 2007, 5(3): 479–493.
- [15] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, *et al.* A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene and Development*, 2006, 20(24): 3407–3425.
- [16] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, *et al.* Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(SI): 731–735.
- [17] Jung J H, Park C M. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2007, 225(6): 1327–1338.
- [18] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction [J]. *Development*, 2006, 133(21): 4211–4218.
- [19] Theissen G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(1): 75–85.
- [20] Cartolano M, Castillo R, Efremova N, *et al.* A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(7): 901–905.
- [21] Hsieh L C, Lin S I, Shih A C, *et al.* Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(4): 2120–2132.