

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2019.10037

眭梦洁, 晏慧君, 王珍珍, 邱显钦, 蹇洪英, 王其刚, 陈敏, 张颢, 唐开学. 月季‘绿萼’花器官发育相关 microRNA 的鉴定及分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 000-000

Sui MJ, Yan HJ, Wang ZZ, Qiu XQ, Jian HY, Wang QG, Chen M, Zhang H, Tang KX. Identification of microRNA associated with flower organ development in *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(1): 000-000

月季‘绿萼’花器官发育相关 microRNA 的鉴定及分析

眭梦洁^{1,2}, 晏慧君², 王珍珍^{2,3}, 邱显钦², 蹇洪英², 王其刚²,
陈敏², 张颢^{2*}, 唐开学^{2*}

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院花卉研究所, 昆明 650205; 3. 云南大学农学院, 昆明 650091)

摘要: 利用高通量测序技术, 构建了中国古老月季‘绿萼’(*Rosa chinensis* ‘Viridiflora’)和‘月月粉’(*R. chinensis* ‘Old Blush’)花蕾期的 microRNA(miRNA)文库, 并对其进行了测序和序列分析。结果显示, 在‘绿萼’文库中, 鉴定到已知的 miRNA 成熟体 39 个, miRNA 前体 42 个; 预测到新的 miRNA 成熟体 56 个, 前体 57 个。在‘月月粉’文库中, 鉴定到已知 RNA 成熟体 39 个, 已知 miRNA 前体 40 个; 预测到新的 miRNA 成熟体 53 个, 前体 57 个。与‘月月粉’相比, ‘绿萼’中差异表达的 miRNA 有 31 个, 其中 17 个上调、14 个下调。荧光定量 PCR 实验结果表明, miR156、miR398 和 miR535 在 2 种月季的花蕾期表达上调, 而 miR167、miR172 和 miR396 表达下调。进一步检测 miR172 和 miR156 在 2 种月季不同花器官中的表达差异, 发现 miR172 在‘绿萼’的花瓣、雌、雄蕊中表达显著下调, 提示 miR172 可能通过负调控其靶基因 *RcAP2* 的表达, 在‘绿萼’花器官发育过程中起重要作用。

关键词: 月季品种‘绿萼’; 花器官发育; MiRNA 高通量测序; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)01-0037-10

Identification of microRNA associated with flower organ development in *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’

Sui Meng-Jie^{1,2}, Yan Hui-Jun², Wang Zhen-Zhen^{2,3}, Qiu Xian-Qin², Jian Hong-Ying²,
Wang Qi-Gang², Chen Min², Zhang Hao^{2*}, Tang Kai-Xue^{2*}

(1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Flower Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 3. School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: In this study, two independent microRNA (miRNA) libraries of *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’ at the flower bud development stage were constructed and sequenced with Illumina sequencing. In total, 39 known miRNAs and 42 known pre-miRNAs were discovered, and 56 novel miRNAs and 57 novel pre-miRNAs were predicted in the ‘Viridiflora’ library. In total, 39 known miRNAs and 40 known pre-miRNAs were identified, and 53 novel miRNAs and 57 novel pre-miRNAs were predicted in the ‘Old Blush’ library. Compared with ‘Old Blush’, there were 31 differentially expressed miRNAs in ‘Viridiflora’, with 17 up-regulated and 14 down-regulated. The RT-qPCR results showed that the

收稿日期: 2018-08-01, 退修日期: 2018-09-27。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660579, 31872144); 云南省学术技术带头人后备人才项目(2017HB067)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31660579, 31872144) and Academic and Technical Talents Training Project of Yunnan Province (2017HB067).

作者简介: 眭梦洁(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为月季花发育(E-mail: suimengjie@outlook.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhanghao7898@sina.com; kxtang@hotmail.com)。

expressions of miR156, miR398, and miR535 were up-regulated, whereas those of miR167, miR172, and miR396 were down-regulated in ‘Viridiflora’, identical to those obtained by sequencing. The expressions of miR172 and miR156 in different floral organs of the two rose species were detected by RT-qPCR. We found that miR172 was down-regulated in the petals, pistils, and stamens of ‘Viridiflora’. Furthermore, *RcAP2* was previously reported to be up-regulated in relative flower organs, suggesting that miR172 may negatively regulate the expression of its target gene *RcAP2*. Thus, miR172 may play an important role in the development of floral organs of ‘Viridiflora’.

Key words: *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’; Flower organ development; MiRNAs high-throughput sequencing; RT-qPCR

现代月季起源于中国, 以‘月月粉’ (*Rosa chinensis* ‘Old Blush’) 和‘绿萼’ (*R. chinensis* ‘Viridiflora’) 为代表的中国古老月季品种是珍贵的月季种质资源^[1]。现代月季类型多样、花色繁多^[2], 是世界上最重要的观赏植物之一。其中花色、花型奇特的月季品种受到市场的欢迎^[3]。月季品种‘绿萼’的花朵形态十分奇特, 表现为花瓣、雄、雌蕊均转变为萼片状, 具有独特的观赏价值, 在欧美各国的花卉市场深受欢迎^[4]。同时, ‘绿萼’作为花器官发育同源异型突变体, 也是研究花发育的宝贵材料^[5]。

几百年来, 有关‘绿萼’这一独特中国古老月季品种的成因有多种推测, 但一直没有定论^[5]。Krussman^[6]在 1981 年报道了‘绿萼’是单瓣月季花 (*R. chinensis* ‘Jaquin’) 的自然突变体。丁正民^[7]采用电子显微观察和药效实验的方法对‘绿萼’的成因进行了研究, 发现‘绿萼’是由于类菌原体 (MLO) 亦称植原体 (Phytoplasma) 侵染引起的绿瓣病。Chmelnitsky 等^[8]的研究证实‘绿萼’是由于“ABC 模型”中控制花器官形成的 *AGAMOUS* (*RcAG*) 基因的表达受到抑制所致。而 Yan 等^[9]采用交互嫁接技术证实了‘绿萼’花器官的异常发育不是由植原体引起, 同时电镜观察和植原体保守基因组序列分析结果也得到了相同的结论; 进一步采用 RT-qPCR 方法, 对 *RcAPETALA2* (*RcAP2*)、*RcAG* 等基因在‘绿萼’叶片及各轮花器官 (萼片、花瓣、雄、雌蕊) 中的表达情况进行了分析, 发现 A 类基因 *RcAP2* 在‘绿萼’花瓣、雌、雄蕊中上调表达, 而 C 类基因 *RcAG* 在雌、雄蕊中表达显著下调。但有关 *RcAG* 的表达如何被抑制, *RcAP2*

的表达如何被上调等问题尚缺乏深入研究。

MicroRNA (miRNAs) 在真核生物中广泛存在, 许多 miRNA 对植物的开花发育具有重要的调节作用^[10]。研究表明, miR172 作为最早被发现的 miRNA 之一^[11], 在多种植物中参与了花器官的形成^[12]。已经发现, miR172 可以通过调节 *AP2* 基因的表达, 在花器官发育过程中起重要作用; miRNA172 的异位表达及过量表达将导致靶基因的功能缺失, 从而产生花器官转变的表型^[13]。MiR156 同样与植物花器官的发育密切相关^[14], 且 miR156 和 miR172 在年龄途径上起重要调控作用^[15]。

‘绿萼’是中国古老月季的一个自然突变体, 其特异的花器官在无性繁殖过程中能够稳定遗传。为了深入研究 miRNA 在月季花器官发育中的作用, 本研究通过高通量测序技术, 对中国古老月季品种‘月月粉’和‘绿萼’的 miRNA 进行分析, 比较 2 种月季中差异表达的 miRNA, 并对差异 miRNA 进行靶基因预测及 RT-qPCR 验证, 以期阐明 miRNA 在月季花发育过程中的调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国古老月季材料取自云南省农业科学院花卉研究所雨树村基地 (图 1)。当‘绿萼’及‘月月粉’花芽直径生长至 0.5 cm 时, 分别采集植物的花芽、萼片、花瓣、雄、雌蕊, 经液氮冷冻后保存于 -80℃ 超低温冰箱。

1.2 RNA 提取及 miRNA 测序

使用 RNA 提取试剂盒, 分别提取‘绿萼’和



图 1 中国古老月季‘绿萼’(A)及‘月月粉’(B)
Fig. 1 *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ (A) and ‘Old Blush’ (B)

‘月月粉’花芽的总 RNA, 以及萼片、花瓣、雄、雌蕊的总 RNA。

利用 Small RNA Sample Pre Kit 试剂盒构建‘绿萼’和‘月月粉’文库。总 RNA 经反转录合成 cDNA, PCR 扩增目的片段。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的片段, 经回收后得到‘绿萼’和‘月月粉’花芽的 cDNA 文库, 然后进行 HiSeq/MiSeq 测序。

1.3 MiRNA 序列信息分析

高通量测序获得的原始序列需要通过数据处理得到高质量的有效序列片段。本研究首先使用 Bowtie 0.12.9 软件将长度范围为 18~30 nt 的小 RNA 定位到参考序列上(转录组数据), 然后将匹配到的小 RNA 与月季 miRBase 数据库中的序列进行比对, 得到各样品匹配上的小 RNA 详细情况。如有月季 ncRNA 注释信息, 则用其 ncRNA 序列注释所测得的小 RNA; 如没有, 则选取 Rfam 中的 tRNA、rRNA、snoRNA、snRNA 来注释测序得到的小 RNA。根据 miRNA 前体的发夹结构, 预测新的 miRNA。结合 miREvo^[16] 和 miRDeep2^[17] 软件, 根据小 RNA 的二级结构和酶切位点等信息预测新 miRNA, 并统计匹配到的小 RNA 的序列长度及其出现次数等信息。分析新的和已知的 miRNA 所属家族, 了解月季中 miRNA 家族在其它物种中的分布情况。

利用在线软件 psRNATarget 对上述已知和新的 miRNA 进行靶基因预测, 找出 miRNA 和靶基因之间的对应关系, 并对每组差异表达 miRNA 的靶基因集合分别进行 GO (Gene ontology) 分析

(<http://www.geneontology.org/>) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)^[18] 富集分析。

1.4 候选 miRNA 的 RT-qPCR 分析

利用 RNA 反转录试剂盒, 分别对‘绿萼’和‘月月粉’的花蕾及不同组织部位的 RNA 进行去 DNA 反应, 然后进行反转录得到 cDNA。采用 RT-qPCR 方法对 miR156、miR172、miR167、miR396、miR398 和 miR535 在‘绿萼’和‘月月粉’花蕾中的表达情况进行分析; 检测 miR172 和 miR156 在植物不同部位的表达差异, 实验以 *RcGAPDH* (登录号: AB370120) 作为内参基因。

RT-qPCR 反应采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪完成, 重复 3 次。反应体系为 20 μ L, PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 共 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 MiRNA 文库的构建及测序

本研究利用高通量测序法, 分别从中国古老月季‘绿萼’和‘月月粉’中获得了 27 272 600 和 27 622 551 条序列片段(reads)。去除质量低及不符合要求的序列后, 最终得到 26 685 169 和 26 763 971 条有效序列(表 1)。

本研究从‘绿萼’和‘月月粉’序列的有效片段中, 筛选出长度为 18~30 nt 的 miRNA 进行后续分析。2 种月季中, miRNA 长度范围主要集中在 21~24 nt, 其中 24 nt 的 miRNA 数量最多(图 2), 约占 49.15%。以 2 种月季相应组织的转录

表 1 数据产出质量
Table 1 Quality of sequencing data

样本 Sample	原始数据 Raw data	有效数据 Clean data	比例 (%) Proportion	错误率 (%) Error rate	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
‘绿萼’	27 272 600	26 685 169	97.85	0.01	98.33	96.24	47.54
‘月月粉’	27 622 551	26 763 971	96.89	0.01	98.55	96.91	47.88

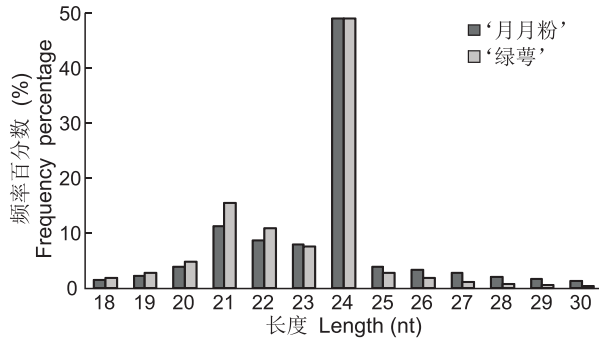


图 2 小 RNA 总片段的长度分布统计
Fig. 2 Length distribution of total fragments of small RNA (sRNA)

组数据为参考序列，将长度适合的 miRNA 定位到参考序列，分析小 RNA (sRNA) 在其中的分布情况。结果显示，‘绿萼’匹配到的参考序列有 12 431 895 条，‘月月粉’有 12 676 976 条。对所有 microRNA 与各类 RNA 序列进行比对，注释情况按照检测的优先级进行总结，依次排序为：已知 miRNA > 核糖体 RNA > 转运 RNA > 细胞内有小核 RNA > 核仁小 RNA > 重复相关小 RNA > 新 miRNA > 反式作用干扰小 RNA (表 2)。

2.2 ‘绿萼’及‘月月粉’中 miRNA 分析

本研究将匹配到参考序列上的序列片段与 miRBase 数据库中月季 miRNA 序列进行比对，从 2 个月季文库中均鉴定出 39 个已知 miRNA，包括：miR156、miR159、miR167、miR169、miR171、miR172、miR319、miR398 等，分别属于 21 个 miRNA 家族。序列分析结果表明，这些基因在进化上存在一定的保守性。

新 miRNA 预测依据 miRNA 前体的标志性发夹结构^[19, 20]。本研究采用 Blastn 搜索和发夹结构预测，在‘绿萼’文库中，鉴定到已知 miRNA 成熟体 39 个、已知 miRNA 前体 42 个；预测到的 novel miRNA 成熟体 56 个，前体 57 个。在‘月月粉’文库中，鉴定到已知 RNA 成熟体 39 个、已知

miRNA 前体 40 个；预测到的 novel miRNA 成熟体 53 个，前体 57 个(表 3)。

研究表明，高通量测序不仅可以检测出 miRNA 的种类，而且还可以检测到不同 miRNA 的表达丰度^[19, 20]。比较‘绿萼’和‘月月粉’文库中差异表达的 miRNA，发现 miR156、miR398、miR535 等 22 个 miRNA 均为上调表达；miR167、miR172 和 miR396 等 23 个 miRNA 为下调表达(表 4)。其中 miR156 在‘绿萼’中的表达丰度是‘月月粉’的 3.2 倍，而 miR172 的表达丰度降低了 3.4 倍。

2.3 MiRNA 靶基因的预测

本研究以‘绿萼’和‘月月粉’相同组织和发育时期的转录组数据作为靶基因集，对 2 个月季文库中发现的保守候选 miRNA 进行靶基因预测(表 5)。结果显示，从 2 个文库中共预测到 109 个靶基因，其中 miR172 的靶基因为 *RcAP2*；miR156 的靶基因编码 Squamosa 启动子结合蛋白 (Squamosa promoter binding like, SPL) 家族的成员；miR396 的靶基因编码了生长调节基因；miR828 的靶基因为转录因子 MYB23。对这些靶基因进行功能注释，发现它们均参与了植物花器官的发育或与开花相关。

表 2 经注释的小 RNA 数量
Table 2 Numbers of reads for each small RNA (sRNA) classification identified

RNA 类型 RNA types	‘绿萼’ No. of ‘Viridiflora’	‘绿萼’比例 (%) Percentage	‘月月粉’ No. of ‘Old Blush’	‘月月粉’比例 (%) Percentage
小 RNA 总数 Total of sRNA	12 431 895	100	12 676 976	100
已知 miRNA Known miRNA	607 054	4.88	388 600	3.07
核糖体 RNA rRNA	855 075	6.88	1 314 248	10.37
转运 RNA tRNA	3	0	4	0
细胞内有小核 RNA snRNA	4610	0.04	6777	0.05
核仁小 RNA snoRNA	22 282	0.18	31 545	0.25
新 miRNA Novel miRNA	75 937	0.61	48 605	0.38
反式作用干扰小 RNA tasiRNA	342 560 469	2.76	10 524 374	2.10
其它 Others	266 819	84.66	10 620 378	83.78

表 3 ‘绿萼’及‘月月粉’中已知 miRNA 信息
Table 3 Prediction of known miRNAs and their families in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

编号 No.	成熟序列(5'-3') Mature sequence (5'-3')	MiRNA	编号 No.	成熟序列(5'-3') Mature sequence (5'-3')	MiRNA
1	ACCUGGCUCUGAUACCAUAAC	miR1511	22	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG	miR172
2	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	miR156	23	UUGGACUGAAGGGAGCUC	miR319
3	UGACAGAAGAUAGAGAGCAC	miR156	24	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	miR390
4	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	miR159	25	CAUCCAAAGGGAUCGCAUUGA	miR393
5	UGCCUGGCUCUCUGUAUGCCA	miR160	26	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC	miR393
6	UCGAUAAACCUUGCAUCCAG	miR162	27	UUGGCAUUCUGUCCACCUCC	miR394
7	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	miR164	28	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC	miR395
8	UGGAGAAGCAGGGCACAUUGCU	miR164	29	UCCACAGCUUUCUUGAACGU	miR396
9	UCGGACCAGGCUUCAUUC	miR166	30	UCCACAGCUUUCUUGAACUU	miR396
10	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA	miR167	31	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	miR397
11	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGA	miR167	32	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	miR398
12	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUUA	miR167	33	CGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	miR398
13	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA	miR168	34	UCUGCCAAAGGAGAAUUGCCC	miR399
14	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG	miR169	35	UUAGAUUCACGCACAAACUCG	miR403
15	UGAGCCAAGGAUGACUUGCCA	miR169	36	UCUGCAUUGCACCUGCACCU	miR530
16	UUGAGCCGCGCCAAUAUCACU	miR171b	37	UGACGACGAGAGAGCAGCAGC	miR535
17	UUAUUGAACCGGACCAUAUC	miR171	38	CGAACUUAUUGCAACUAGCUU	miR7125
18	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	miR171	39	UUAGAUGACCAUCAACAAACA	miR827
19	UUGAGCCGCGUCAUAUCUCC	miR171	40	UCUUGCUCAAAUGAGUAUJCCA	miR828
20	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	miR172a	41	CUCGUUGUCUGUUCGACCUUG	miR858
21	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	miR172			

进一步对差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 和 KEGG 分析, 获得了具有功能注释的靶基因。差异表达 miRNA 的候选靶基因在 GO 中的分布状况显示, 它们主要分为生物学过程、细胞成分和分子功能 3 大类。通过 Pathway 显著性富集确定了候选靶基因参与的主要生化代谢和信号转导途径, 靶基因注释主要集中在氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢、苯丙素的生物合成及淀粉、蔗糖的代谢途径等方面, 其中淀粉和蔗糖的代谢途径富集程度最大。

2.4 候选 miRNA 及其靶基因的 RT-qPCR 分析

本研究以 *RcGAPDH* 基因为内参, 对 miR156、miR172、miR167、miR396、miR398 和 miR535 的表达情况进行实时荧光定量 PCR 检测 (图 3)。结果表明, ‘绿萼’花器官与对照‘月月粉’相比, miR156 和 miR398 的相对表达量较高; miR172、miR167 相对表达量明显降低; 而 miR535 和 miR396 在 2 种月季中表达量基本一致。说明 miR156、miR172、miR167 和 miR398 可能参与调控了月季花器官的发育。

表 4 ‘绿萼’及‘月月粉’中差异表达的 miRNA
Table 4 Differential expression of miRNAs in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

MiRNA	‘绿萼’表达量 ‘Viridiflora’ expression level	‘月月粉’表达量 ‘Old Blush’ expression level	表达量比 Expression level ratio	P 值 P value
上调表达的 miRNA				
Up-regulated miRNA				
miR398b	13 379.48	4801.24	2.78	0
novel_19	3825.29	1660.25	2.30	7.43E-208
novel_59	103.99	5.93	17.52	1.94E-24
novel_32	133.38	19.28	6.91	4.38E-23
novel_36	122.08	22.25	5.48	8.90E-19
novel_73	332.33	157.27	2.11	8.00E-17
miR1511	126.60	41.54	3.04	5.31E-12
novel_53	70.08	17.80	3.93	3.88E-09
novel_60	115.30	45.99	2.50	9.89E-09
novel_49	76.86	31.15	2.46	3.83E-06
miR156f	42.95	13.35	3.21	3.32E-05
novel_48	24.86	4.45	5.58	5.89E-05
miR535b	6.78	1.48	4.57	0.05081
novel_50	11.30	4.45	2.53	0.06975
miR393a	15.82	11.86	1.33	0.40428
miR393b	18.08	11.86	1.52	0.22104
miR390	3429.65	2584.60	1.32	7.68E-34
miR169a	6.78	5.93	1.14	0.76963
miR162	9897.83	9891.81	1.00	0.02586
miR168	1139.44	816.03	1.39	1.11E-15
miR159	648 350.92	632 009.37	1.02	0
miR535b	6.78	1.48	4.57	0.05081
下调表达的 miRNA				
Down-regulated miRNA				
miR167a	2871.23	6436.28	0.44	6.61E-285
miR167c	1923.95	4286.40	0.44	8.79E-188
miR167d	1953.34	4216.66	0.46	9.14E-173
miR530	196.69	1164.70	0.16	4.46E-161
novel_22	1180.14	2464.42	0.47	1.91E-94
miR172a	180.86	612.76	0.29	3.67E-53
miR7125	88.17	403.56	0.21	1.77E-47
miR171b	88.17	201.78	0.43	7.54E-11
novel_46	18.08	59.34	0.30	2.81E-06
novel_37	18.08	44.51	0.40	0.00105
miR172c	22.60	45.99	0.49	0.00637
novel_77	11.30	28.19	0.40	0.00834
novel_39	0	7.41	0	0.00888
novel_68	13.56	29.67	0.45	0.01724
miR396	4.52	14.83	0.30	0.01917
novel_47	4.52	13.35	0.33	0.03811
miR394a	10 203.04	12 694.52	0.80	5.84E-46
miR396a	1600.65	2470.35	0.64	4.47E-37
miR396b	61 532.5	75 842.19	0.81	4.03E-255
miR397	4.52	14.83	0.30	0.01917
miR403	402.42	477.75	0.84	0.03721
miR858	3307.56	4281.95	0.77	5.17E-23
miR166a	45 548.56	83 569.29	0.54	0

表 5 miRNA 与靶基因的对应关系
Table 5 Relationship between miRNAs and target genes

MiRNA	靶基因序列号 Target ID	功能注释 Target annotation
miR390	c28548_g3_i3	UDP-3-O-酰基葡萄糖胺 N-酰基转移酶
miR166a	c22134_g1_i2	同源异域型-亮氨酸拉链蛋白 ATHB-15
miR156c	c25879_g1_i2	Squamosa 启动子结合蛋白 13B
miR156c	c21302_g2_i2	E3 泛素蛋白酶 ATL4
miR156c	c23466_g3_i1	Squamosa 启动子结合蛋白 12
miR156f	c10979_g1_i1	Squamosa 启动子结合蛋白 17
miR156f	c19880_g2_i1	Squamosa 启动子结合蛋白 7
miR156f	c24715_g4	ABC transporter G family member 15, AtABCG15
miR159	c19919_g1	转录因子 MYB 44
miR162	c29138_g1_i3	Endoribonuclease dicer homolog 1, DCL1
miR166	c22134_g1_i1	同源异域型-亮氨酸拉链蛋白 ATHB-8
miR168	c28474_g4_i1	Protein argonaute 1, AGO-1
miR169	c23036_g1_i1	Nuclear transcription factor Y, NFYA
miR172a	c27740_g2_i2	花同源蛋白 AP2
miR172d	c27740_g1_i3	花同源蛋白 AP2
miR393	c26302_g1_i2	TIR 蛋白
miR394	c21642_g2_i1	F-box only protein 6, F-box 6
miR396	c22628_g2_i1	生长调节因子 5
miR396a	c21462_g1_i1	生长调节因子 6
miR396b	c21056_g2_i1	生长调节因子 12
miR397	c20815_g1_i1	Putative laccase-11, lac11
miR399	c14645_g2_i1	磷脂酶 Dγ1
miR403	c24905_g1_i1	Protein argonaute 2, AGO2
miR535	c25561_g9_i1	结构域蛋白 DUF21
miR7125	c43862_g1_i1	Zinc transporter 1, ZNT1
miR828	c18857_g1_i2	转录因子 MYB23
miR858	c21314_g2_i1	转录因子 MYB23
miR535b	c25561_g9_i4	假定结构域蛋白 DUF21
miR171b	c18464_g2_i1	Scarecrow-like protein 6, SCL6

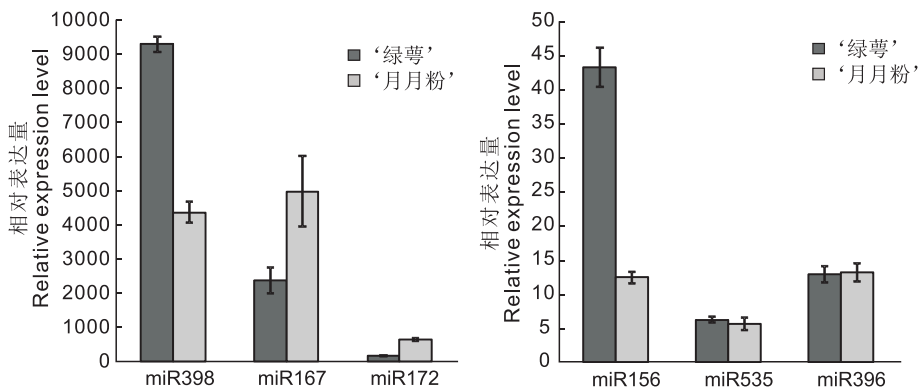
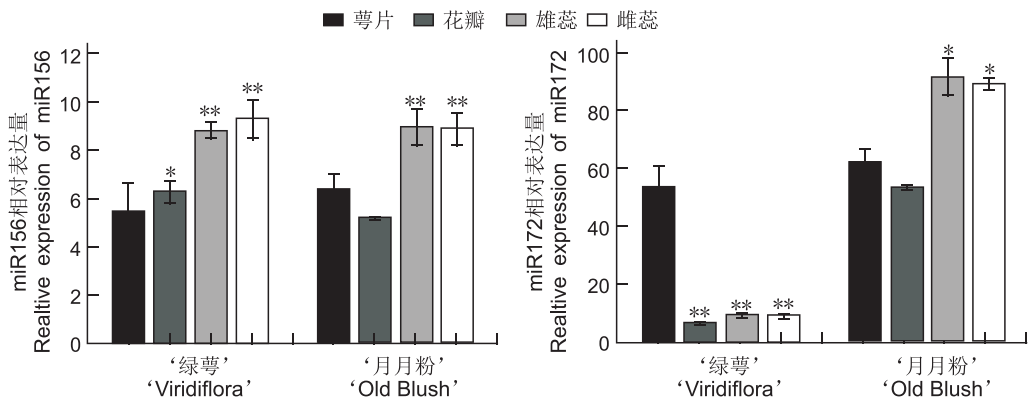


图 3 miRNA 在‘绿萼’及‘月月粉’中的差异表达
Fig. 3 Differential expression analysis of miRNAs in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

本研究进一步对 miR172 和 miR156 在‘绿萼’及‘月月粉’幼蕾期(花蕾直径 0.5 cm 时)的萼片、花瓣、雄、雌蕊 4 个不同组织的表达情况进行 RT-qPCR 分析。结果发现(图 4)，与‘月月粉’相

比，miR172 在‘绿萼’花瓣、雄、雌蕊中的表达极显著下调($P < 0.01$)；miR156 在‘绿萼’各器官中表达量与‘月月粉’相差不大。说明 miR172 可能参与了‘绿萼’花器官的萼片化发育。



* 和 ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

* and ** indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

图 4 miR156、miR172 在‘绿萼’及‘月月粉’不同花器官中的表达

Fig. 4 Expression of miR156 and miR172 in different floral organs of ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

3 讨论

目前,有关月季花发育相关 miRNA 及其靶基因的研究报道较少。为了进一步鉴定与月季花器官发育相关的 miRNA 靶基因,研究 miRNA 对花发育过程的影响,本研究构建了月季品种‘绿萼’和‘月月粉’花芽的 miRNA 文库并进行了高通量测序。研究结果表明,2 个文库各产生了超过 2.6×10^7 条有效序列片段,获得了数量较多、质量较高的 miRNA 序列。月季 miRNA 的长度主要集中在 21~24 nt,其中以 24 nt 最多,这与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)^[21, 22]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[23, 24]、烟草 (*Nicotiana benthamiana* L.)^[25]、芦笋 (*Asparagus officinalis* L.)^[26]、橡胶 (*Eucommia ulmoides* Oliv.)^[27] 等的研究结果一致。

已经发现,miRNA 可以在转录水平上降解 mRNA 靶分子来调控基因的表达,也可以抑制靶基因的翻译来调控靶基因的表达及功能^[28]。本研究鉴定到的 miR156、miR159、miR167、miR169、miR172、miR319、miR396 等 miRNA 均与花器官发育相关。为了进一步探索这些 miRNA 的功能,本研究对其进行了靶基因的预测及功能分类,经过候选靶基因的 GO 富集分析,明确其基因功能主要分为细胞组分、生物学过程和分子功能 3 大类,并从 2 个月季文库中共预测到 109 个靶基因。其中,月季 miR172 有 2 个靶基因 AP2。AP2 家族在花器

官 ABC 模型中属于 A 类基因。对拟南芥的研究表明,该类基因缺失后,植株表现出花瓣缺失以及萼片向心皮的同源转化,同时花期提前^[29]。月季 miR156 有 4 个靶基因编码 Squamosa 启动子结合蛋白 (SPL) 家族成员,这类转录因子是植物生长周期转变、诱导开花及果实发育等过程中重要的调控因子^[30, 31]。miR396 有 3 个靶基因编码生长调节基因,例如:miR396 通过对 *GRF* (*Growth regulating factor*) 基因进行转录后水平的抑制,控制 *GRF* 的表达部位,参与叶片发育的调控^[32];水稻 (*Oryza sativa* L.) miR396 通过靶基因 *GRF* 调控花器官的发育^[33]。

本研究结果显示,miR172、miR156 和 miR396 等 miRNA 预测的靶基因分别为 AP2、SPL 和 GRF 等转录因子,表明这些 miRNA 及其靶基因参与了‘绿萼’花器官的发育。而这些 miRNA 具有怎样的调控表达模式,以及在月季花器官发育过程中发挥怎样的作用,仍需要进一步研究。

对于开花植物来说,花器官的发育是植物发育过程中的重要阶段。研究表明,miR172 与 miR156 均可通过降解和抑制靶 mRNA 来调控植物花期及花器官的形成^[34]。miR156 通过直接抑制 SPL 基因家族成员的表达,促使植物由营养生长转为生殖生长^[35, 36]。同时,部分 SPL 基因家族成员可以促进 miR172 的表达^[37]。miR172 及其靶基因 AP2 对植物开花时间和花器官的分化起关键的调控

作用^[11, 32]。在拟南芥的研究中发现, *AP2* 与 miR172 的结合位点发生突变会导致花器官发育出现严重缺陷, 且 miR172 在轮内花器官中的表达很可能由 *AP2* 的下调导致^[38]。前期研究中, 我们初步推测‘绿萼’独特的表型与 *RcAP2* 的异位上调和 *RcAG* 的显著下调表达相关^[9]。本研究通过 RT-qPCR 实验, 验证了 miR172 在‘绿萼’的花瓣、雌、雄蕊中表达均显著下调, 其预测的靶基因 *RcAP2* 在各器官中表达量显著上调, 提示 miR172 可能通过负调控 *RcAP2* 的表达, 在‘绿萼’花器官发育过程中起重要作用。

参考文献:

- [1] 张佐双, 朱秀珍. 中国月季[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [2] 刘永刚, 刘青林. 月季遗传资源的评价与利用[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 87-90.
Liu YG, Liu QL. Evaluation and exploitation of genetic resources in roses[J]. *Journal of Plant Genetic Resource*, 2004, 5(1): 87-90.
- [3] Yan HJ, Yang JK, Zhang H, Li SB, Zhang T, et al. Use of digital gene expression to discriminate gene expression in different developmental stages of *Rosa chinensis* ‘Pallida’[J]. *Acta Horticulturae*, 2015, 1064: 115-121.
- [4] Chmelnitsky I, Azizbekova N, Khayat E, Zieslin N. Morphological development of normal and phyllody expressing *Rosa hybrida* cv. Motrea flowers[J]. *Plant Growth Regul*, 2002, 37: 215-221.
- [5] Bendahmane M, Dubois A, Raymond O, Bris ML. Genetics and genomics of flower initiation and development in roses[J]. *J Exp Biol*, 2013, 64(4): 847-857.
- [6] Krussman G. The complete book of roses[M]. Portland: Timber Press, 1981.
- [7] 丁正明. 月季绿瓣病[J]. 上海师范学院学报, 1983, 1: 90-97.
Ding ZM. The rose phyllody[J]. *Journal of Shanghai Normal University*, 1983, 1: 90-97.
- [8] Chmelnitsky I, Khayat E, Zieslin N. Involvement of RAG, a rose homologue of AGAMOUS, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea[J]. *Plant Growth Regul*, 2003, 39(1): 63-66.
- [9] Yan H, Hao Z, Wang Q, Jian H, Qiu X, et al. The *Rosa chinensis* cv. Viridiflora phyllody phenotype is associated with misexpression of flower organ identity genes[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(638): 1-14.
- [10] Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2730-2741.
- [11] Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484-1495.
- [12] Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. MicroRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9412-9417.
- [13] Wei Q, Ma C, Xu Y, Wang T, Chen Y, et al. Control of chrysanthemum flowering through integration with an aging pathway[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 829.
- [14] Wang JW, Czech B, Weigel D. MiR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738-749.
- [15] Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [16] Wen M, Shen Y, Shi S, Tang T. miREvo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 140.
- [17] Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 37-52.
- [18] Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 480-484.
- [19] Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen R H, et al. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(21): e141.
- [20] Qiu DY, Pan XP, Wilson IW, Li FL, Liu M, et al. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*)[J]. *Gene*, 2009, 436(1-2): 37-44.
- [21] Xie ZX, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givanand SA, et al. Expression of *Arabidopsis* miRNA genes[J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2145-2154.
- [22] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in

- Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3407–3425.
- [23] Wei B, Cai T, Zhang RZ, Li AL, Huo NX, *et al.* Novel microRNAs uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. [J]. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9(4): 499–511.
- [24] 黄儒, 苍晶, 于晶, 卢宝伟, 刘丽杰, 等. 冬小麦小 RNA 高通量测序及生物信息学分析 [J]. *植物学报*, 2014, 49(1): 8–18.
- Hang R, Cang J, Yu J, Lu BW, Liu LJ, *et al.* Solexa sequencing and bioinformatics analysis of small RNA in winter wheat [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2014, 49(1): 8–18.
- [25] Baksa I, Nagy T, Barta E, Havelda Z, Vórallyay E, *et al.* Identification of *Nicotiana benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1025.
- [26] Chen J, Yi Z, Li Q, Wang Y, Chen L, *et al.* Identification of miRNAs and their targets through high-throughput sequencing and degradome analysis in male and female *Asparagus officinalis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 80.
- [27] Wang L, Du H, Wuyun TN. Genome-wide identification of microRNAs and their targets in the leaves and fruits of *Eucommia ulmoides* using high-throughput sequencing [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1632.
- [28] Yokotani N, Nakano R, Imanishi S. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated [J]. *J Exp Biol*, 2009, 60(12): 3433–3442.
- [29] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: S1–S17.
- [30] Wang JW, Czech B, Weigel D. miR156-Regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738–749.
- [31] Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, *et al.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 750–759.
- [32] Horiguchi G, Kim G, Tsukaya H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2005, 43(1): 68–78.
- [33] Liu H, Guo S, Xu Y, Li C, Zhang Z, *et al.* OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJMJ706 and OsCR4 [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165(1): 160–174.
- [34] Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, *et al.* The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2736–2748.
- [35] 侍婷, 高志红, 章镇, 庄维兵. MicroRNA 参与植物花发育调控的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(13): 267–271.
- Shi T, Gao ZH, Zhang Z, Zhuang WB. Advance of research on microRNA in flower development regulation [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(13): 267–271.
- [36] Wang JW, Czech B, Weigel D. MiR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738–749.
- [37] 陈罡. 植物 MicroRNA 对花发育调控研究进展 [J]. *辽宁林业科技*, 2017, (2): 55–58.
- [38] Grigorova B, Mara C, Hollender C, Sijacic P, Chen XM, *et al.* LEUNIG and SEUSS co-repressors regulate miR172 expression in *Arabidopsis* flowers [J]. *Development*, 2011, 138(12): 2451–2456.

(责任编辑: 周媛)