

油棕 (*Elaeis guineensis*) 中果皮发育过程中 miRNA 的表达动态分析

方良, 梁远学, 李东栋, 曹献英, 郑育声*

(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海南大学材料化工学院, 海口 570228)

摘要: 以 CTAB 法提取油棕 (*Elaeis guineensis*) 中果皮 5 个不同发育时期 (G1 ~ G5) 的小 RNA。从前期研究获得的油棕小 RNA 测序数据库中筛选 12 个候选 miRNA, 实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 检测其在果实发育过程中的表达量变化, 并进一步对显著差异表达的 miRNA 进行靶基因预测。结果表明: 中果皮 5 个不同发育时期小 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.7~2.0 之间; 浓度分别是 289、364、476、213、390 ng/ μ L; qRT-PCR 检测结果显示, 12 个候选 miRNA 在 5 个发育时期均显著性差异表达, 特别是在中果皮发育第 4 个时期 (G4) 和第 5 个时期 (G5) 表达量极显著增高, 其中 miR395 和 miR156 在第 4 个时期表达量最高; miR395 和 miR528 在发育第 5 时期表达量最高; 靶基因预测结果显示差异表达的部分 miRNA, 其靶基因可能参与了脂肪酸代谢通路, 如磷脂酸磷脂酶和磷脂酶 D。本研究筛选的与脂肪酸代谢相关的 miRNA 为今后油棕脂肪酸代谢调控通路研究提供了可能的线索。

关键词: 油棕; 脂肪酸代谢; miRNA; 实时定量 PCR; 靶基因预测

中图分类号: S565. 9; Q943. 2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)03-0304-09

Dynamic Expression Analysis of miRNAs during the Development Process of Oil Palm Mesocarp

FANG Liang, LIANG Yuan-Xue, LI Dong-Dong, CAO Xian-Ying, ZHENG Yu-Sheng*

(National Key laboratory Base of Tropical Biological Resource Sustainable Utilization, College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: We obtained high quantity small RNA from the mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis*) and screened fatty acid biosynthesis related miRNAs. The extracted method of CTAB was improved and then employed to isolate small RNA from the mesocarp of oil palm nuts at five development stages (G1–G5). Twelve miRNAs were screened from our previous database of oil palm small RNA using bioinformatics analysis. Relative expression of each miRNA was determined by stem-loop real-time quantitative PCR (qPCR) and further predicted the targets of these miRNAs. The results indicated that the OD_{260}/OD_{280} values of the small RNA were between 1.7 and 2.0, and the concentrations of G1 to G5 were 289 ng/ μ L, 364 ng/ μ L, 476 ng/ μ L, 213 ng/ μ L, and 390 ng/ μ L, respectively. Relative expression detected by qPCR showed that the twelve miRNAs exhibited significantly different expression during the five development stages, especially high expression level in the fourth stage (G4) and fifth stage (G5). Among them, miR395 and miR156 were highest in the G4 phase and miR395

收稿日期: 2012-10-24, 修回日期: 2013-03-15。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160717, 31060259, 31260193); 海南大学青年基金项目 (qnj1001); 海南大学科研启动基金项目 (kyqd1237)。

作者简介: 方良 (1987-), 男, 海南大学硕士研究生, 主要研究方向为植物基因工程 (E-mail: fl030212@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence): 郑育声, 女, 海南大学生物工程专业副教授, 研究领域为植物生化与分子生物学 (E-mail: hainanzyh@yahoo.com.cn)。

and miR528 were highest in the G5 phase. Target prediction suggested that some targets of these differently expressed miRNAs were involved in the fatty acid metabolism pathway, such as phosphatidate, phosphatase and phospholipase D. In this study, high quantity small RNA was isolated by the improved CTAB method. qPCR further determined that the twelve candidate miRNAs were differently expressed during the five development stages, of which five miRNAs may be involved in the regulatory pathway of fatty acid metabolism.

Key words: Oil palm (*Elaeis guineensis*); Fatty acid metabolism; miRNA; Real-time quantitative PCR; Target gene prediction

油棕(*Elaeis guineensis*)俗称油椰子,属棕榈科椰子亚科油棕属,是热带多年生单子叶木本油料作物。油棕平均年产棕榈油 4.17 t/hm²,一些高油品种产量可达 16 t/hm²,是其他油料作物(油菜、大豆、花生)年平均单产的 6~20 倍,是世界上生产效率最高的产油植物,被人们誉为“世界油王”^[1]。油棕主要产品有棕榈油(palm oil)和棕榈仁油(palm kernel oil),分别来自中果皮(mesocarp)和果仁(kernel)。其中,棕榈油在脂肪酸的种类和含量方面表现出不同于其他大宗油料作物的特性:棕榈酸(16:0)含量最高,占 44.3%;油酸(18:1),占 38.7%;亚油酸(18:2),占 10.5%。这种“平衡油”的优势使得棕榈油在消费量上超过大豆油成为世界第一大食用油,广泛用于食品、化工。同时,棕榈油也是很好的工业原料,被称为“工业味精”,是制造生物柴油的理想原料,在全球的油脂贸易中占有举足轻重的地位^[2]。

目前,国内外针对油棕的研究主要集中在引种栽培、种植资源的收集等方面,而针对脂肪酸代谢途径及其调控研究鲜有报道^[3]。microRNA(miRNA)是一类有 19~25 个核酸长度的内源 RNA 单链小分子,又称微小 RNA,是小 RNA 里面的一种。在植物生长发育过程中,miRNA 主要以完全互补或部分互补的方式与靶 mRNA 分子结合,引起 mRNA 切断或导致转录抑制,介导转录后调控,在植物生长发育、激素响应、时期转换、抗逆抗病等多个方面起到了至关重要的作用^[4]。在不同物种,不同生理时期 miRNA 表达水平具有显著差异性。以往的研究表明,动物细胞内存在 miRNA 参与脂肪酸调控的作用机制^[5]。在我们的前期研究过程中发现油棕脂肪酸合成所必需的关键酶在脂肪酸含量不同的组织中出现差异表达^[6],而这些关

键酶已被国内外的研究者预测为特定 miRNA 的靶标分子^[7]。目前,在部分油料作物,如油菜中已筛选得到与油脂成分和含量相关的 miRNA,提示植物中可能也存在类似动物细胞的脂肪酸调控作用机制,但有关 miRNA 在油棕脂肪酸合成代谢中的作用机制研究尚未见报道。此外,植物组织 RNA 的提取是进行植物分子生物学研究的必要前提。在进行反转录 PCR、cDNA 合成等过程均需要高质量、高纯度和完整性好的 RNA^[8]。由于油棕果皮中含有大量的油脂、蛋白质、多糖物质,使得高质量 RNA 的提取较为困难,特别是小 RNA 的提取方法,目前尚无此类研究的相关报道。

本研究以油棕为材料,对传统 CTAB 法进行改良,获得了高质量小 RNA。同时在课题组前期油棕小 RNA 数据分析基础上,选择 12 个候选 miRNA,进一步用实时荧光定量 PCR 法检测油棕中果皮发育过程中 miRNA 表达量变化,对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测,并验证油棕中果皮发育过程中候选 miRNA 的表达水平,筛选脂肪酸合成代谢相关的 miRNA,为后期 miRNA 参与脂肪酸合成代谢调控的功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

油棕果实采自中国热带农业科学院椰子研究所。参照文献[9],将 5 个不同发育时期分别命名为 G1、G2、G3、G4、G5;G1 至 G5 分别为油棕果授粉后生长约 30~60 d,60~100 d,100~120 d,120~140 d,140~160 d。取油棕果中果皮,液氮冷冻后保存 -70℃。TIANScrip cDNA 第一条链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real

Time) 和 RNAiso 试剂购于宝生物工程(大连)有限公司;引物由上海英骏技术有限公司(Invitrogen)合成;其他相关试剂购自上海生物工程公司。

1.2 油棕中果皮小 RNA 的提取

利用 RNAiso 试剂,结合传统的 CTAB 法提取小 RNA。油棕中果皮液氮研磨后,取 0.5 g,加入 2.5 mL 2% CTAB 液振荡混合,65℃水浴 8~10 min;分装,每管约 700 μL 溶液,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提蛋白,剧烈振荡 5 min,冰上静置 5 min,12000 r/min,4℃离心 10 min,取上清,重复抽提一次;加入等体积的 RNAiso 试剂匀浆,室温静置 5 min,12000 r/min,4℃离心 5 min。取上清,加入 1/5 RNAiso 体积量的氯仿振荡混匀,室温静置 5 min,12000 r/min,4℃离心 15 min。取上清,加入等体积的异丙醇,室温静置 10 min,12000 r/min,4℃离心 10 min,弃上清,75%乙醇清洗沉淀,12000 r/min,4℃离心 5 min,弃上清,沉淀室温干燥 3~5 min,40 μL 无 RNA 酶的 dH₂O 溶解沉淀,-80℃保存,备用。按上述方法分别抽提 5 个发育时期油棕果中果皮小 RNA。

1.3 小 RNA 完整性检测

取 3 μL 油棕中果皮小 RNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,电泳条件为 5 × TAE 缓冲液,80 V,20 min。

1.4 小 RNA 浓度和纯度分析

提取不同发育时期的小 RNA 样品,各取 2 μL 用 DEPC 水稀释至 200 μL 混匀,用核酸蛋白测定仪测定 260 nm 和 280 nm 波长的吸光值,计算出 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值及小 RNA 的浓度。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测油棕中果皮 miRNA 的表达量

1.5.1 引物的合成

根据本实验室前期对油棕小 RNA 测序数据进行生物信息学分析的结果,选择 12 个候选 miRNA 进行表达量分析(序列见表 1)。采用 qRT-PCR 法分别检测它们在油棕中果皮中 5 个不同发育时期的表达量水平。参考文献[10]进行引物设计,每个 miRNA 设计其反转录特异茎环引物,qPCR 扩增的特异正向引物和通用反向引物。生物信息学分析获得油棕 U6 的部分序列(89 nt)(表 1),以此作为

内参,根据序列,设计其正向、反向扩增引物(引物序列详见表 2)。

表 1 miRNA 和内参基因的序列(U6)
Table 1 Sequences of miRNAs and control (U6)

miRNA 名称 miRNA name	序列(5'~3') Sequences (5'-3')	长度(核苷酸) Length (nt)
egu-miR156	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	20
egu-miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	21
egu-miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	21
egu-miR164	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	21
egu-miR166	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	21
egu-miR168	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC	21
egu-miR395	CTGAAGTGTTGGGGGAAGCTC	21
egu-miR528	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	21
egu-miR529	AGAAGAGAGAGAGTACAGCCT	21
egu-miR535	TGACAACGAGAGAGAGCACGC	21
egu-miR2916	GGGGGCTCGAAGACGATCA	19
egu-miR5179	TTTTGCTCAAGACCGCGCAAC	21
egu-U6	ATCCGATAAAATTGGAACGATA- CAGAGAAGATTAGCATGGCCCC- TGCGCAAGGATGACACGCACAA- ATCGAGAAATGGTCCAAATTTT	89

1.5.2 反转录合成 cDNA 第一链

cDNA 的合成采用 TIANScript cDNA 第一条链合成试剂盒。先加入 0.5 μg 小 RNA、0.4 μL 茎环引物、0.4 μL U6 反向引物、2 μL dNTP (2.5 mmol/L)、11.2 μL 无 RNase dH₂O;70℃加热 5 min 后迅速冰上冷却 2 min。离心 10 s 后,依次加入如下组分:4 μL 5 × M-MLV Buffer、0.5 μL RNasin (40 U/μL)、1 μL TIANScript M-MLV (200 U/μL) 至最终反应体系为 20 μL。用移液枪轻轻混匀上述混合液,进行如下反应:16℃ 10 min,37℃ 15 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min 后终止反应,置冰上进行后续试验或-20℃冷冻保存。针对每条 miRNA,5 个不同发育时期的小 RNA 都进行一次反转录合成,分别获得每条 miRNA 在 5 个时期中的 cDNA。每个实验重复 3 次。

1.5.3 qRT-PCR

以 cDNA 为模板,建立如下 qRT-PCR 反应体系(20 μL):10 μL SYBR Premix Ex Taq™ II,0.7 μL miRNA 正向引物,0.7 μL miRNA 反向引物,0.4 μL ROX Reference Dye II (×50),1.0 μL 上述 cDNA 第一链,7.2 μL 无 RNase dH₂O。内参 U6 反应体系同上,应用其正向和反向引物。实时荧光定量 PCR 仪:ABI 7500 Real-Time PCR

表2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 Sequences of primers for qRT-PCR

miRNA 名称 miRNA name	引物名称 Primer name	序列(5'~3') Sequences(5'-3')	长度(核苷酸) Length(nt)
egu-miR156	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTC	50
	正向引物	CGAGGTGACAGAAGAGAGTG	20
egu-miR159	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAGAGC	50
	正向引物	GGTGGTTTGATTGAAGGGA	20
egu-miR162	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCGGAT	50
	正向引物	TGGTGTGATAAACCTCTGC	20
egu-miR164	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCACG	50
	正向引物	GGTAGTGAGAAAGCAGGGCA	20
egu-miR166	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGAA	50
	正向引物	GACTATCGGACCAGGCTTCA	20
egu-miR168	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTCCCG	50
	正向引物	CATGATCGCTTGGTGACAGT	20
egu-miR395	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGTTC	50
	正向引物	GGTTGCTGAAGTGTTTGGGG	20
egu-miR528	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTCCTC	50
	正向引物	GTTATTGGAAGGGGCATGCA	20
egu-miR529	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGCTG	50
	正向引物	GGCTGAGAAGAGAGAGAGTA	20
egu-miR535	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCGTGC	50
	正向引物	GGAGGTGACAACGAGAGAGA	20
egu-miR2916	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGATCG	50
	正向引物	ATTTAGGGGGCTCGAAGACG	20
egu-miR5179	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTTGCG	50
	正向引物	TAGGCTTTTGCTCAAGACCG	20
egu-U6	反向通用引物	TCCGAGGTATTCGCAC	16
	正向引物	ATTGGAACGATACAGAGAAGATTAG	25
	反向引物	AATTTGGACCATTTCTCGATTTGTG	25

System, 反应程序为: 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s, 60℃退火 41 s, 循环 40 次。用 2^{-ΔΔCt} 方法计算特定 miRNA 的相对于内参的表达量。没有模板的 qRT-PCR 作为每组试验中的阴性对照。每个实验重复 3 次。

1.6 miRNA 靶基因预测分析

利用 blastx 对本课题组获得油棕果中果皮转录组 Unigene 基因比对到蛋白数据库、Swiss-Prot、KEGG 和 COG (evalue < 0.00001), 并通过 blastn 将 Unigene 比对到核酸数据库 (evalue < 0.00001), 得到与给定 Unigene 具有最高序列相似性的蛋白, 从而得到该 Unigene 的蛋白功能注释信息。

利用 miRNA 与靶基因 mRNA 3' UTR 端近乎完全互补的特性, 从 5 个不同发育时期油棕果中果皮转录组数据、网络 EST 资源以及 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 等数据库中预测上述差异表达的 miRNA 的靶基因。

参考文献 [11], 采用 FASTA 程序比对成熟 miRNA 与转录组数据中单个基因的匹配程度, E 阈值设为 200。最小折叠自由能 (minimum folding free energy, MFE) 通过四基板间隙接头序列 (four-base gap linker sequence), 至少达到 miRNA 完全匹配值的 73%。靶基因序列与 miRNAs 序列的错配碱基数小于 4, 最大期望值、最大循环数、最大缺失或插入数、最大的 G-U 摆动配

对数和其他最大错配对数分别为 3、3、1、6 和 3。

1.7 统计分析

t 检验和卡方检验用于比较不同组之间表达水平的差异，结果以至少 3 次独立实验的平均值 ± 标准差表示。多组之间比较，采用单因子变异数分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 方法进行比较。*p* < 0.05 作为显著差异的指标。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

油棕果中果皮 5 个时期的小 RNA 样品，经琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 1。5 个时期的小 RNA 样品均能观察到比较清晰的单一条带。

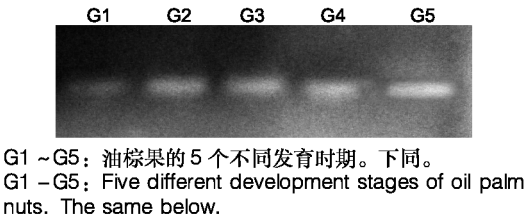


图 1 油棕中果皮 5 个不同时期的小 RNA 电泳图
Fig. 1 Small RNA isolated from the mesocarp of oil palm nuts at five different development stages

2.2 小 RNA 浓度和纯度

核酸蛋白仪测定油棕 5 个不同发育时期中果皮小 RNA，其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分别是 1.88、1.87、1.72、2.02、1.76，都在 1.7~2.0 之间，说明其纯度较高。通过计算，小 RNA 终浓度分别是 289、364、476、213、390 ng/μL (表 3)。

表 3 油棕中果皮小 RNA 提取的结果
Table 3 Results of small RNA isolation from the mesocarp of oil palm nuts

发育时期 Development stage	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (ng/μL) Concentration
G1	1.88	289
G2	1.87	364
G3	1.72	476
G4	2.02	213
G5	1.76	390

2.3 荧光定量 PCR 结果

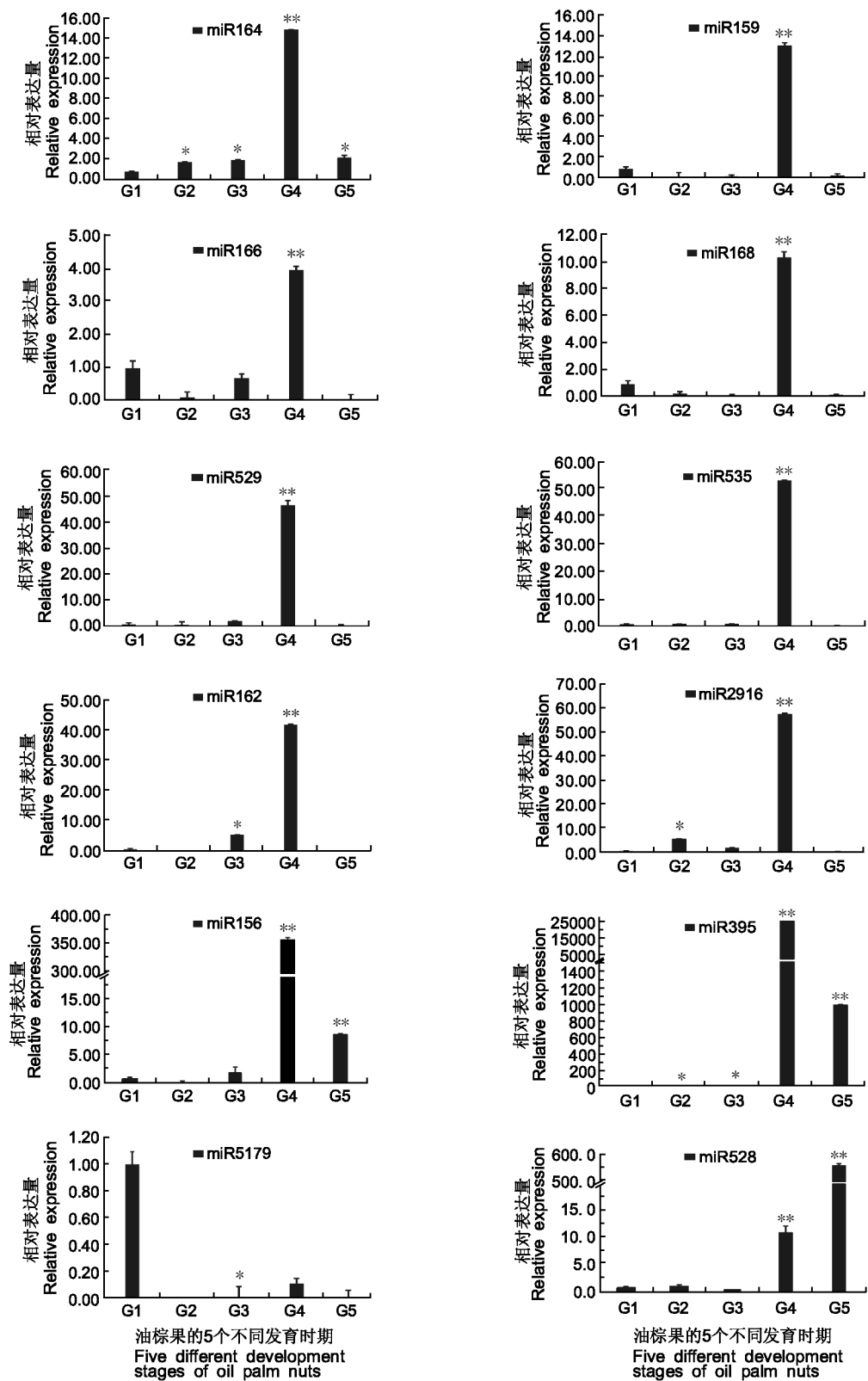
运用荧光定量 PCR 方法分析了 12 个 miRNA 在油棕中果皮 5 个不同发育时期中的表达量，结果表明：12 个 miRNA 均表现出差异表达。其中，10 个

miRNA 表现为在第 4 个时期表达量达到最高峰，分别是 miR164、miR159、miR166、miR168、miR529、miR535、miR162、miR2916、miR156 和 miR395，它们在 G4 时期的表达量分别是 G1 时期的 15.03、3.95、10.48、46.85、51.98、13.09、42.52、58.08、344.89、25180.16 倍，特别是，miR395 表达量尤其高，其次是 miR156。在 G5 时期中，表达量最高的是 miR395，其次是 miR528，分别为 G1 时期的 982.29 和 560.28 倍。不同的是，miR5179 在 G1 时期有少量表达，而后急剧降低，在 G2 至 G5 时期几乎检测不到，没有显著性差异 (图 2)。12 个 miRNA 的 G2 至 G5 时期都以 G1 为参照，进行统计学分析，结果见图 2。

2.4 部分差异表达的 miRNA 预测靶基因

对差异表达的 miRNA 在油棕转录组测序数据 (结果另文显示) 中进行靶基因预测，并将预测的靶基因序列在 NCBI 中进行比对，选择同源性最高的基因作为参考，进行基因注释，预测其生物学功能。

12 个 miRNA 均能预测到其调控的靶基因 (表 4)。如 egu-miR159 的预测靶基因 Unigene40034_OILP_1，注释为磷脂酸磷酸脂酶 (Phosphatidate Phosphatase)，同源性 69.41%；egu-miR156 的预测靶基因 Unigene32511_OILP_1，与其同源性 (72%) 最高的是 SPL9 (promoter-binding protein SPL9)，一种启动子结合蛋白。Unigene10447_OILP_1，与 MADS box 转录因子 (MADS box transcription factor) 高度同源 (同源性 77.5%)，被预测为 egu-miR5179 的靶基因。通过对这些预测靶基因已注释的功能进行分析，发现它们参与不同的生物学过程，如磷脂代谢过程、ATP 合成、调控转录作用等。其中，5 个预测靶基因已有报道直接或间接地参与脂肪酸代谢过程：如 miR159 的预测靶基因粗面内质网内的磷脂酸磷酸脂酶 (Phosphatidate Phosphatase)^[12] 和 miR528 的预测靶基因磷脂酶 D (phospholipase D) 可能直接参与脂肪酸代谢途径^[13,14]；miR156 的预测靶基因启动子结合蛋白 SPL9 (promoter-binding protein SPL9)^[15,16]，miR162 的预测靶基因线粒体基质载体蛋白家族成



*表示 $p < 0.05$, 显著性差异; **表示 $p < 0.01$, 极显著性差异。
* $p < 0.05$, Significant difference; ** $p < 0.01$; Extremely significant difference.

图2 12个 miRNA 在油棕中果皮发育的不同时期差异表达情况
Fig. 2 Different expression of twelve miRNAs in oil palm mesocarp at five different stages

员 (mitochondrial substrate carrier family protein)^[17,18] 和 miR529 的预测靶基因锌指蛋白 (zinc finger protein)^[19] 可能间接参与调控脂肪酸代谢过程(表 4)。

3 讨论

一种有效的小 RNA 提取方法, 能够获得较高的纯度和产量, 是进一步进行分子生物学研究的前提和基础。在油棕果皮中含有大量油脂、多糖和酶类物质, 会给整个过程 RNA 提取造成很大的困难, 特别是小 RNA, 其含量相对较少, 约占总 RNA 的 1/10, 因此, 常规方法往往很难满足分子生物学对 RNA 质量的要求。本研究利用 CTAB 法进行改

良, 不仅可以很好地破碎细胞, 有效地分离核蛋白和核酸的复合物, 同时结合 RNAiso 试剂可以有效地沉淀, 富集小 RNA 分子。这是首次有关油棕小 RNA 提取方法的报道, 将为油棕小 RNA 相关研究以及棕榈科树种小 RNA 的抽提奠定坚实基础。

目前, miRNA 对性状形成的调控机制也已成为植物学和作物学领域专家关心的热点和前沿之一^[24]。本研究中, 筛选的 12 个候选 miRNA, 在中果皮发育的 5 个时期均表现出差异表达。有意义的是, 在这一过程中中果皮内的脂肪酸组成和含量也在发生变化^[9], 特别是, 大部分候选 miRNA 在果实发育后期, 即 G4 和 G5 时期, 表达量显著升高。其中, miR395、miR528 和 miR156 的表达水

表 4 差异表达的 miRNA 靶基因预测结果
Table 4 Predicting of the targets of differentially expressed miRNAs

miRNA 名称 miRNA name	预测靶基因* Predicted target*	同源性基因注释** Homologous gene**	同源性程度 Degree of homology	可能参与的生物学过程 Potential biological processes involved	与脂肪酸合成代谢的相关性 Relevance to the metabolism of fatty acid synthesis
egu-miR159	Unigene40034_ OILP_ 1	磷脂酸磷酸脂酶 (Phosphatidate phosphatase)	69. 41%	磷脂代谢过程 ^[12]	有相关性 ^[12]
egu-miR528	Unigene30286_ OILP_ 1	磷脂酶 D (Phospholipase D)	60. 85%	磷脂代谢过程 ^[13]	有相关性 ^[14]
egu-miR156	Unigene32511_ OILP_ 1	启动子结合蛋白 SPL9 (Promoter-binding protein SPL9)	72%	转录因子 ^[15]	有相关性 ^[16]
egu-miR162	Unigene20329_ OILP_ 1	线粒体基质载体蛋白家族 (Mitochondrial substrate carrier family protein)	62. 16%	参与 ATP 合成 ^[17]	有相关性 ^[18]
egu-miR529	Unigene7853_ OILP_ 1	锌指蛋白 (Zinc finger protein)	71. 23%	转录因子	有相关性 ^[19]
egu-miR166	Unigene60813_ OILP_ 1	同源域-亮氨酸拉链蛋白 (Homeobox-leucine zipper protein)	72. 05%	转录因子	未见报道
egu-miR395	Unigene50301_ OILP_ 1	SBP 类蛋白 1 (Squamosa promoter-binding-like protein1)	85. 01%	转录因子 ^[20]	未见报道
egu-miR2916	Unigene22879_ OILP_ 1	mRNA 前体加工因子 40 (pre-mRNA-processing factor 40)	75. 3%	RNA 加工	未见报道
egu-miR164	Unigene7855_ OILP_ 1	转录因子 NAC35 (Transcriptional factor NAC35)	58%	转录因子 ^[21]	未见报道
egu-miR168	Unigene135_ OILP_ 1	appr-1-p 酶家族蛋白 (appr-1-p processing enzyme family protein)	63. 58%	蛋白代谢相关 ^[22]	未见报道
egu-miR535	Unigene26865_ OILP_ 1	未注释			
egu-miR5179	Unigene10447_ OILP_ 1	MADS box 转录因子 (MADS box transcription factor)	77. 5%	植物器官发育 ^[23]	未见报道

注: * 表示油棕转录组测序序列号; ** 表示油棕转录组测序序列在 NCBI 中比对获得同源性最高的基因注释。
Notes: * Sequence number of oil palm transcriptome sequencing; ** Highest homology gene annotation of oil palm transcriptome sequencing sequence alignment in the NCBI.

平极显著升高,这与中果皮在发育后期脂肪酸含量和组成明显增多呈正相关性,暗示了这些 miRNA 可能参与了脂肪酸合成代谢调控网络,并发挥正向调控作用;而 miR5179 的表达则呈负相关性,可能发挥着负调控作用。

靶基因注释的功能分析结果表明,部分候选 miRNA 的预测靶基因是参与脂肪酸合成代谢通路中的酶基因,提示了这些 miRNA 可能通过调控它们的预测靶基因来参与油棕脂肪酸合成代谢,对形成脂肪酸的含量或种类发挥重要的调节作用。例如,miR528 在中果皮发育第 5 个时期(G5)高表达,其预测靶基因的磷脂酶 D(phospholipase D),据报道磷脂酶 D 促进植物细胞内产生游离脂肪酸^[14],由此可能暗示,在中果皮发育后期,miR528 高表达,可能通过调控磷脂酶 D,抑制细胞内过多游离脂肪酸的生成,有助于果实中脂类物质的形成和积累。另有文献报道^[25],磷脂酶 D 通过作用于细胞膜上的磷脂结合的不饱和脂肪酸,释放出亚麻酸(linolenic acid),其作为底物合成茉莉酸(jasmonic acid)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate),可见,miR528 可能通过作用磷脂酶 D,调控脂肪酸代谢,从而参与植物细胞内重要的茉莉酸通路,间接参与细胞内激素合成、植物香味合成等过程。

本研究还发现,miR156 的预测靶基因为启动子结合蛋白(promoter-binding protein SPL)家族成员 SPL9。已有报道^[15],SPL9 作为上游调控因子,可能通过 miR172,调控 AP2 样基因(AP2-like gene)的表达,这暗示了 miR156 很可能通过调控 SPL9 参与脂肪酸合成代谢。此外,miR162 的预测靶基因线粒体基质载体蛋白家族成员(mitochondrial substrate carrier family protein),以及 miR529 的预测靶基因一种调节因子——锌指蛋白(zinc finger protein),这两者都已有报道与脂肪酸合成代谢过程相关^[18,19]。这些共同提示了在油棕的脂肪酸代谢调控过程中,极少数的 miRNA 可能调控着直接参与脂肪酸合成代谢的功能基因;更多地是,miRNA 通过作用于众多的转录因子,间接地调控脂肪酸的代谢过程。众所周知,与糖代谢和氨基酸代谢一样,脂肪酸合成代谢是细胞内一条基本的途径,为植物细胞的生长和发育以及植物重要性

状的形成提供基本的物质来源。与植物其他性状形成和发育类似,miRNA 通过作用不同的重要功能基因,调控不同脂肪酸的合成代谢,从而参与植物器官形成、花期、香味形成、抗环境胁迫等过程。

油棕作为全球最为重要的油料作物种类之一,其脂肪酸生物合成通路调控网络的全面揭示,以及控制特定脂肪酸形成的蛋白关键调控因子的筛选研究将是油棕重要的基础性研究工作之一。本研究提取油棕中果皮小 RNA 的方法,为油棕后续分子生物学研究提供前提,也为其他油料植物小 RNA 抽提方法的建立提供借鉴。此外,12 个 miRNA 的差异表达模式为进一步验证相关 miRNA 的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Murphy D J. Future prospects for oil palm in the 21st century: Biological and related challenges [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2007, 109: 296–306.
- [2] Ho C W, Wan Aida W M, Maskat M Y, Osman H. Changes in volatile compounds of palm sap (*Arenga pinnata*) during the heating process for production of palm sugar[J]. *Food Chem*, 2007, 102(4): 1156–1162.
- [3] 曹建华,林位夫,张以山,邹积鑫. 油棕的产量潜力及其影响因子探析[J]. *中国热带农业*, 2009(6): 48–50.
- [4] Naqvi A R, Sarwat M, Hasan S, Roychodhury N. Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9): 3163–3168.
- [5] Zhao X, Feng D, Wang Q, Abdulla A, Xie X J, Zhou J, Sun Y, Yang E S, Liu L P, Vaitheesvaran B, Bridges L, Kurland I J, Strich R, Ni J Q, Wang C, Ericsson J, Pessin J E, Ji J Y, Yang F. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2417–2427.
- [6] Xu L, Yuan Y J, Zhang L, Wan L, Zheng Y S, Zhou P, Li D D. Identification and characterization of differential gene expression in the mesocarp and kernel of oil palm nuts using suppression subtractive hybridization[J]. *Tree Genet Genomes*, 2011, 7(5): 999–1010.

- [7] Sun G. MicroRNAs and their diverse functions in plants[J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 80(1): 17–36.
- [8] 李东栋, 范永梅. 椰子果肉组织中总 RNA 的提取及质量分析[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(6): 883–886.
- [9] Tranbarger T J, Dussert S, Joët T, Argout X, Summo M, Champion A, Cros D, Omore A, Nouy B, Morcillo F. Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism[J]. *Plant Physiol*, 2011, 156 (2): 564–584.
- [10] Chen C F, Ridzon D A, Broomer A J, Zhou Z H, Lee D H, Nguyen J T, Barbisin M, Xu N L, Mahuvakar V R, Andersen M R, Lao K Q, Livak K J, Guegler K J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (20): e179. doi: 10.1093/nar/gni178.
- [11] Chen X Y, Wang J, Shen H J, Lu J, Li C X, Hu D N, Dong X D, Yan D S, Tu L L. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3): 1193–1199.
- [12] Abul H. J. Ullah K S, Casey G, Jay S. Purification, characterization, and bioinformatics studies of phosphatidic acid phosphohydrolase from *Lagenaria siceraria*[J]. *ABC*, 2012, 2(4): 403–410.
- [13] Wang X M. Regulatory functions of Phospholipase D and Phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 566–573.
- [14] Wang G L, Ryu S, Wang X M. Plant phospholipases: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 861: 123–137.
- [15] Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J W, Weigel D, Poethig R S. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, 138 (4): 750–759.
- [16] Xie F L, Frazier T P, Zhang B H. Identification, characterization and expression analysis of microRNAs and their targets in the potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Gene*, 2011, 473(1): 8–22.
- [17] Hourton-Cabassa C, Rita Matos A, Zachowski A, Moreau F. The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42 (4): 283–290.
- [18] Himms-Hagen J, Harper M E. Physiological re of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis[J]. *Exp Biol Med*, 2001, 226 (2): 78–84.
- [19] Li S J, Cronan J E. Putative zinc finger protein encoded by a conserved chloroplast gene is very likely a subunit of a biotin-dependent carboxylase [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20(5): 759–761.
- [20] Yamaguchi A, Wu M F, Yang L, Wu G, Poethig R S, Wagner D. The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETAL1 [J]. *Develop Cell*, 2009, 17(2): 268–278.
- [21] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 79–87.
- [22] Putics A, Filipowicz W, Hall J, Gorbalenya A E, Ziebuhr J. ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture [J]. *J Virol*, 2005, 79(20): 12721–12731.
- [23] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 464–489.
- [24] Sun Y H, Lu S, Shi R, Chiang V L. Computational prediction of plant miRNA targets [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 744: 175–186.
- [25] Wang X M. Phospholipase D in hormonal and stress signaling[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5 (5): 408–414.