

桃果实中 MiR167a 与其靶基因的鉴定 及对 IAA 的响应分析

张彦苹¹, 朱旭东², 王 晨², 刘照坤³, 李庆魁¹

(1 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008; 2 南京农业大学 园艺学院, 南京 210095; 3 苏州市农业科学院, 江苏苏州 215000)

摘 要:以‘小白凤’水蜜桃的果实为试材, 利用 miR-RACE 技术验证了桃基因组中预测的 ppe-miR167a 的精确序列, 克隆了预测的其 3 个 *ARFs* 靶基因 *PpARF6*、*PpARF8* 和 *PpARF6-like* 的 ORF 序列, 并对预测靶基因进行了系统进化和保守结构域分析; 同时降解组测序鉴定了 ppe-miR167a 的靶基因, 并对二者间的作用模式及作用频度进行了分析。结果显示: (1) ppe-miR167a 的精确序列与预测序列在 5' 和 3' 端均存在 1 个碱基的差异, 预测的 3 个靶基因 *ARFs* 均含有高度保守的 B3 和生长素响应 DNA 结合域; 系统进化树分析显示, 桃中 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 均与巴旦杏的亲缘关系较近, 其次为梅和甜樱桃。 (2) 降解组结果表明, 预测的 3 个靶基因中, 仅 *PpARF8* 能够被 ppe-miR167a 裂解, 而未在 *PpARF6* 和 *PpARF6-like* 上检测到裂解位点。 (3) 外源 IAA 处理后, ppe-miR167a 的表达量在处理组中低于对照组, 而靶基因 *PpARF8* 及 3' 端裂解产物的表达均高于对照组。研究表明, 桃果实中 ppe-miR167a 通过介导 *PpARF8* 的裂解影响生长素信号途径参与果实发育的调控。

关键词:桃; ppe-miR167a; 靶基因; IAA; 生长素信号

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Response Analysis of IAA and Identification of miR167a and Its Target Genes in Peach Fruit

ZHANG Yanping¹, ZHU Xudong², WANG Chen², LIU Zhaokun³, LI Qingkui¹

(1 Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008, China; 2 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3 Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: We determined the precise sequence of peach miR167a by using miR-RACE PCR reactions of the peach (*Prunus persica*) cultivar ‘Xiaobaifeng’, cloned three predicted target genes *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like* of ppe-miR167a and analyzed the phylogenetic and conserved domains of the three genes. The target genes of ppe-miR167a were further identified by degradome sequencing technology, and the mode and frequency of interaction between ppe-miR167a and the target genes were analyzed. The results showed: (1) the accurate sequence of ppe-miR167a was different from the predicted sequence in the 1 nucleotide at the 5' end and 3' end. All the three target genes *ARFs* contained highly conserved B3 and auxin response DNA binding domains. Phylogenetic tree analysis indicated that *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like* in peach were closely related to Apricot, followed by plum and sweet cherry. (2) The results of the degradome sequencing displayed that only *PpARF8* could be cleaved by ppe-miR167a among the three predicted target gene and no cleavage sites were detected on *PpARF6* and *PpARF6-like*. (3) The analysis of gene expression of exogenous IAA treated peach showed that the expression of miR167a af-

收稿日期: 2020-10-13; 修改稿收到日期: 2020-12-24

基金项目: 苏州市农业科技创新项目 (SNG2020046); 江苏省科协青年科技人才托举工程 (2018 年度); 江苏高校“青蓝工程”; 国家自然科学基金青年基金 (31601727); 苏州农业职业技术学院博士提升计划科研启动基金

作者简介: 张彦苹 (1986—), 女, 博士, 讲师, 主要从事果树分子生物学研究。E-mail: ypzhang@szai.edu.cn

ter treatment was lower than that in the CK, while the expression of its target gene *PpARF8* and the 3' end cleavage production were higher than those in the CK. Taken together, these findings showed that ppe-miR167a in peach fruit involved in auxin signaling pathway and participated in the regulation of fruit development by mediating the cleavage of its target gene *PpARF8*.

Key words: peach; ppe-miR167a; target genes; IAA; auxin signaling

植物的性状由基因控制,基因的表达被多种调节因子高度调节,以确保各组织的正常发育和功能以及适应外界的变化。MicroRNA(miRNA)是一类长度为 19~24 个核苷酸的内源非编码小 RNA 分子^[1],已被证明通过参与转录后翻译在植物的生长、发育、代谢、信号转导等多方面起调控作用。miRNA 具有在转录后水平与靶基因互补配对,通过剪切或翻译抑制的方式调控靶基因表达的功能。在植物中,目前的研究发现许多生长素相关表型出现在 miRNA-靶基因互作体系中,说明植物 miRNA 直接或者间接地参与了生长素信号通路的调控,在植物的生长发育过程中起到关键调控作用。

生长素信号途径中,生长素和 ARF(auxin response factor)转录因子均为植物生长素响应的关键调节因子^[2]。ARFs 转录因子可以与生长素响应基因启动子区域中生长素响应元件(AuxREs) TGTCTC/GAGACA 发生特异性结合,激活或抑制下游基因的表达^[3]。目前研究发现,植物中 miR160 和 miR167 通过靶向 ARFs 基因参与生长素信号转导调控,进而影响植物的生长发育。如在拟南芥中,miR167 通过调控 ARF6 和 ARF8 的表达影响拟南芥雌蕊、雄蕊以及花瓣的发育^[4]。miR160 能够介导 ARF17 的转录后调控,从而影响植株对生长素的敏感性,进而调控植物体的发育^[5]。此外,在其他植物中也已证实 miR160 及 miR167 家族的靶基因为 ARFs,如番茄 miR167 下调 ARF6 和 ARF8 导致花的发育异常和雌性不育^[6]。miR160a 抑制 *slARF10* 影响番茄叶片的长出及早期果实的发育^[7]。水稻中超量表达 miR167 导致水稻分蘖角度变大和植株矮小,表明 miR167 在调节植株株型上起作用^[8]。在低温状态下,草莓 miR167 通过调节靶基因 ARF8 来调控激素的生物合成从而延缓草莓果实的衰老^[9]。miR167 靶向 ARF8 控制细胞的伸长参与大花牵牛(*Ipomoea nil*)幼苗茎尖,叶原基和雌蕊等器官的发育,并可能间接调控气孔的开放^[10]。在杂柑品种‘清见’的果实发育过程中,伴随着 IAA 含量的变化,miR167 和靶基因 ARF8 的表达量呈现出此消彼长的趋势^[11]。综上,miR167 靶向 ARFs 基因参与调控植物生长发育及生物胁迫

等多个方面,表明二者在植物生长发育过程中具有十分重要的作用。

目前 miR167 的研究集中于拟南芥、水稻、番茄等模式植物中,且大多研究的重点为植株的生长发育调控,有关 miR167 参与生长素信号通路调控果实生长发育的研究还鲜有报道。本项目组前期从桃的基因组中预测到了 miR167a 及其对应的 3 个 ARFs 靶基因^[12],本研究中以桃品种‘小白凤’不同发育时期的果实为实验材料,验证了该品种果实中 ppe-miR167a 的精确序列,克隆了预测的 3 个 ARFs 靶基因的 ORF 并进行了序列进化和保守性分析;qRT-PCR 分析了 miR167a 及其靶基因在果实不同发育时期的空间表达情况;降解组测序确定了桃 ppe-miR167a 与 ARF8 间的裂解作用模式并明确了裂解位点;研究了 ppe-miR167a、ARF8 及其 3' 端裂解产物对外源 IAA 处理的响应,为今后进一步研究 miRNA 参与生长素信号途径调控桃果实发育的分子机制提供了理论支持。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以苏州农业职业技术学院合作试验基地的‘小白凤’水蜜桃(*Prunus persica*)成年树上不同发育时期的果实作为实验材料。于花后 20 d(果实第一次迅速生长期)、50 d(果实硬核期)、75 d(果实第二次迅速生长期)和 90 d(果实成熟期)分别取样。

生长素处理于 2019 年 6 月 10 日(成熟前 30 d)用 0.2 mmol·L⁻¹ 外源 IAA(加 1% 吐温 80)进行活体浸果处理 1 min,清水(加 1% 吐温 80)为对照,处理后 30 d 取样。采集的所有样品带回实验室液氮速冻并放置在一 80℃ 冰箱保存。

1.2 引物合成及生化试剂

实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体序列见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、DNase 酶 I、Power Script II TM 反转录酶、Taq 酶、dNTPs、pMD19-T 载体、DNA Marker、荧光定量染料 SYBR Green I 均购自 TaKaRa 公司,DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Sequences and usage of primers

上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')	用途 Purpose
TTTTTTTTTCTAGATCATGCTGGCAG	GGAGTAGAAAGAAGCTGCCAGCATGAT	miR167a 克隆 Clone of miR167a
TGAAGCTGCCAGCATGATCTA	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG	miR167a qRT-PCR
GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA	ACTGCATTGAACAACGCCTT	U6 扩增 Application of U6
ATGAGGCTCTCATCTGCTGGTT	TCAATACTCGAGTGACCCACG	<i>PpARF6</i> ORF 扩增 Application of <i>PpARF6</i> ORF
TGCTCGTATGTTTGGCCTTG	AGGCCTCGTTTTC CATTTG	<i>PpARF6</i> qRT-PCR
ATGAAGCTTTCAACATCAGGGT	TCAATATTCAAGTGAGCCAAG	<i>PpARF8</i> ORF 扩增 Application of <i>PpARF8</i> ORF
GACATATCCCGTTTCAGCAG	GTCGTCACCAAGGAGAAGCA	<i>PpARF8</i> qRT-PCR
ATGAGACTTTCGTCTTCATCAT	TTAGTAGTCCAGTGAGCCCAAC	<i>PpARF6-like</i> ORF 扩增 Application of <i>PpARF6-like</i>
CTATGATGAGCTGCGCAGTG	TCATTCTCCCGTCAACAAA	<i>PpARF6-like</i> qRT-PCR
GCTCGCTGTTTTCAGTTCTAC	AACATAGGTGAGGCCGCACTT	<i>RP11</i> 扩增 Application of <i>RP11</i>
CGACUGGAGCAGGAGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA		<i>LMWRNA</i> 5' 接头 Dapter of <i>LMWRNA</i> 5'
ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30(A, G, or C)(A, G, C, or T)		cDNA

1.3 方 法

1.3.1 RNA 提取及 miRNA 分离 采用改良 CTAB 法提取不同发育阶段果实中的总 RNA^[12], DNase I 酶(RNase free)消化及氯仿抽提去除基因组 DNA。在总 RNA 基础上,用 4 mol·L⁻¹ LiCl 分离出低分子量 RNA(LMWRNA)与 mRNA^[12]。

1.3.2 cDNA 合成 mRNA 与 LMWRNA cDNA 合成参考 Zhang 等^[12-13]的方法。

1.3.3 桃 miR167a 精确序列验证 以 1.3.2 中合成的 LMWRNA 的 cDNA 为模板,用表 1 中的引物进行扩增,miR-RACE 方法参照 Sun 等进行^[14]。

1.3.4 预测靶基因的克隆及序列分析 根据从桃基因组中预测 miR167a 的 3 个靶基因序列^[12],以所得总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得‘小白凤’桃 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 的 ORF 序列。获得的序列在 NCBI 中进行 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对。利用保守结构数据库(CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)进行保守结构域的分析。系统进化树的构建使用 MEGA 5.0 软件。

1.3.5 降解组测序 依据‘小白凤’桃确定的 4 个发育时期,选取花后 20、50、75 和 90 d 果实的果肉部分进行降解组测序。总 RNA 用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, CA, USA)提取,构建 4 个降解组文库,样品送联川生物公司(杭州)进行单末端(50 bp)测序,测序平台为 Illumina Hiseq 2500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)。

1.3.6 实时荧光定量 RT-PCR 分别以 mRNA、miRNA 以及加 5'端接头和 3'-poly(A)尾巴纯化的

mRNA 反转录合成的 cDNA 为模板,以桃 *RP11* 基因^[15]和 U6 rRNA 为内参进行 qRT-PCR 扩增^[16]。实验重复 3 次,实验数据用 LinRegPCR 和 Excel 2010 软件分析。目的基因的引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 ppe-miR167a 精确序列验证及在不同发育时期桃果实中的表达

依据前期在桃基因组中预测的桃 ppe-miR167a 序列,利用 miR-RACE 技术验证 ppe-miR167a 在桃品种‘小白凤’中的精确序列^[12]。实验结果表明,验证的 ppe-miR167 序列与桃基因组中预测的序列在 5' 和 3' 端均存在一定的碱基差异,即验证序列在 5' 端第 1 个碱基处多了碱基 U,而在 3' 端最后 1 个碱基处少了碱基 G(表 2)。

为进一步了解 ppe-miR167a 在桃果实发育过程中的表达情况,本试验利用 qRT-PCR 对其在‘小白凤’桃果实发育过程中 4 个关键时期的时空表达进行了分析^[17]。结果表明, ppe-miR167a 在花后 20 d 时表达量最高,随着果实进入硬核期, ppe-miR167a 表达量显著下降,自硬核期(花后 50 d)开始, ppe-miR167a 的表达量逐渐上升(图 1)。

2.2 ppe-miR167a 预测靶基因的克隆及序列分析

依据前期利用 psRNA target web server(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)在基因组中预测的 ppe-miR167a 的靶基因结果(表 3),为分析预测的靶基因,以 mRNA 反转录合成的 cDNA 为模板,利用在桃基因组数据库(https://www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v1.0)

中比对到的序列设计引物,克隆得到 *PpARF6*(XM_020562547)、*PpARF8* (XM_020560148) 和 *PpARF6-like*(XM_007217628)的完整 ORF,大小分别为 2 664、1 767 和 2 760 bp(图 2)。保守结构域分析显示 3 个 *ARFs* 基因均含有高度保守的生长

素响应 DNA 结合域(图 3)。

2.3 ppe-miR167a 预测靶基因的系统发育

通过 MEGA 5.0 软件构建了 ppe-miR167a 3 个预测靶基因的系统进化树(图 4),结果显示,桃中 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 均与巴旦杏的亲缘关系较近,其次为梅和甜樱桃。*PpARF6* 和 *PpARF6-like* 与杨树的亲缘关系较远,而 *PpARF8* 与核桃的亲缘关系较远(图 4)。

2.4 桃果实发育过程中 ppe-miR167a 预测靶基因的表达

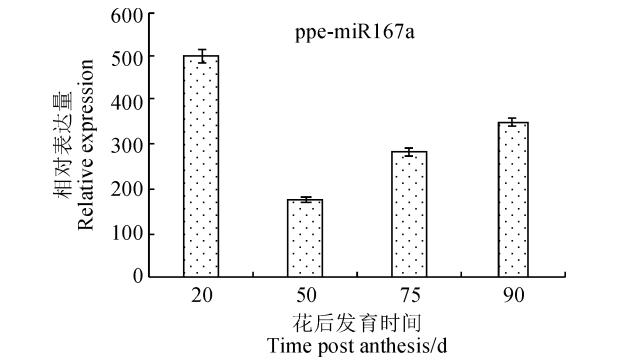
分析 ppe-miR167a 预测靶基因在果实不同发育阶段中的表达结果表明,*PpARF6* 在花后 20 和 75 d 果实中的表达基本一致,在硬核期(花后 50 d)的表达相对较高,花后 90 d 果实中表达量最高(图 5)。*PpARF8* 的表达量在果实第一次快速膨大期(花后 20 d)最高,至硬核期(花后 50 d)有所下降,在随后的两个时期中无显著变化。*PpARF6-like* 的表达量在 4 个发育时期无显著变化(图 5)。分析 ppe-miR167a 与其预测靶基因的表达模式表明, *PpARF8* 与 ppe-miR167a 的表达趋势基本一致, *PpARF6* 和 *PpARF6-like* 的表达与其无明显相关性。因此,预测的 3 个靶基因及其与 ppe-miR167a 间的作用方式均有待进一步深入研究。

2.5 ppe-miR167a 与其靶基因间的作用方式

为验证预测靶基因的真实性及 ppe-miR167a 与靶基因间的作用模式,本研究通过降解组测序进行

表 2 桃 miR167a 预测序列与验证序列比较
Table 2 Comparison the sequences of predicted and validated ppe-miR167a

项目 Item	序列 Sequence (5'→3')
预测 Predicted	GAAGCUGCCAGCAUGAUCAG
验证 Validated	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA



不同小写字母代表显著差异($P<0.05$),下同
图 1 桃果实不同发育时期 ppe-miR167a 的表达
Different normal letters represent significant differences ($P<0.05$), the same as below

Fig. 1 Relative expression of ppe-miR167a in different stages of peach fruits

表 3 预测的桃基因组中 miR167a 的靶基因
Table 3 Predicted ppe-miR167a's target genes from peach genome

预测的靶基因 Predicted target gene	NCBI sequence ID	基因注释 Gene annotation	作用方式 Interaction mode
ppa001179/Prupe. 4G085900	XM_020562547	<i>PpARF6</i>	裂解 Cleavage
ppa003267/Prupe. 3G011800	XM_020560148	<i>PpARF8</i>	裂解 Cleavage
ppa001069/Prupe. 3G182900	XM_007217628	<i>PpARF6-like</i>	裂解 Cleavage

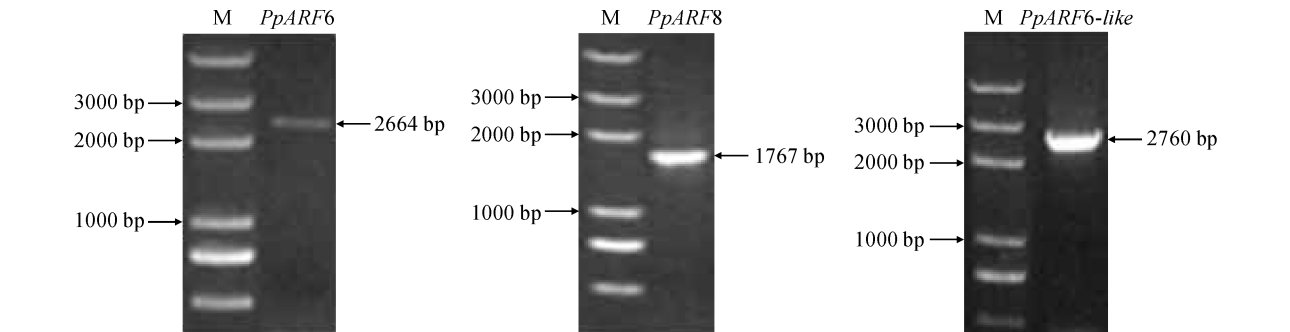


图 2 桃 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 的 ORF 扩增(M. DL5000)
Fig. 2 PCR products of *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like* genes ORF

了鉴定分析。结果表明, ppe-miR167a 以剪切方式作用的靶基因有 2 个, 其一为 ARFs 家族基因, 即 *PpARF8*, 另一个为 *HPR-A* 基因(生物信息学未预测到, 非 *ARF* 基因家族成员), 其与 miR167a 间的作用频度较低, 本研究中不进行详细分析。降解组未检测到 ppe-miR167a 与 *PpARF6* 和 *PpARF6-like* 之间的作用, 说明信息学预测结果存在一定的误差, 有必要进行深入的验证分析。降解组数据显示 ppe-miR167a 作用于靶基因 *PpARF8*

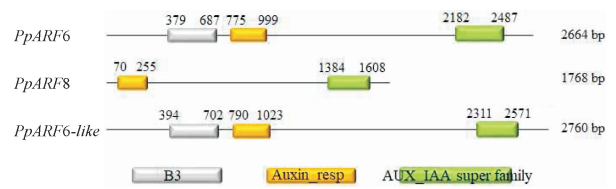
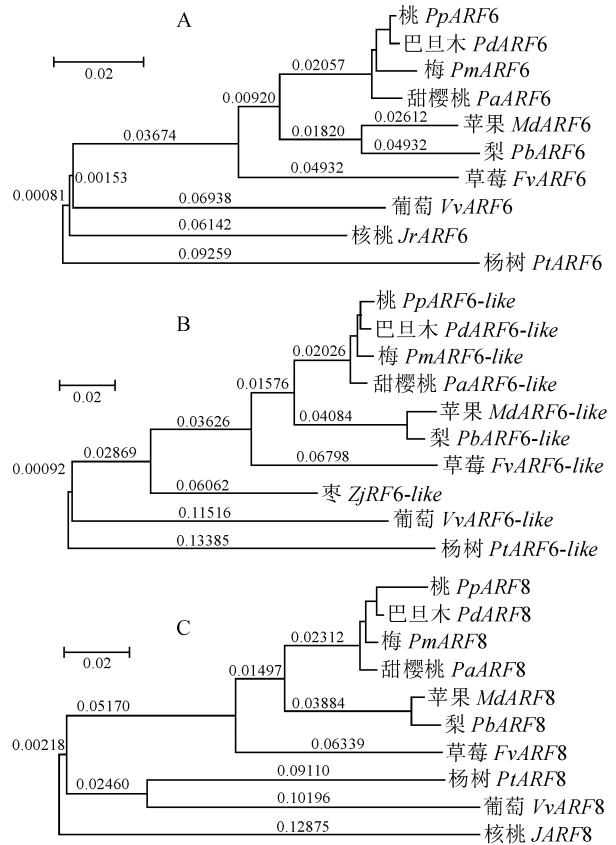


图 3 桃 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 序列的保守结构域分布

Fig. 3 The distribution of conserved domains in *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like* genes



A. *PpARF6*; B. *PpARF6-like*; C. *PpARF8*

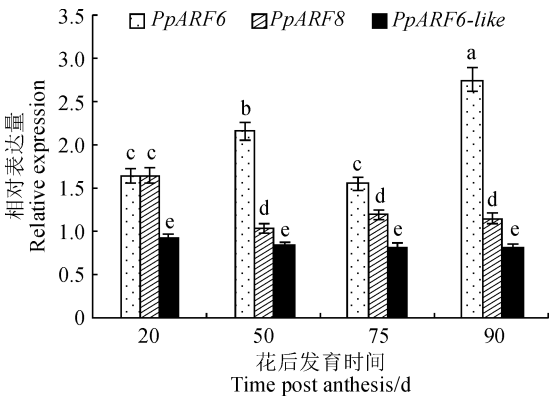
图 4 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 预测靶基因的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of predicted target genes *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like*

的裂解位点位于 miR167a 5' 端的第 9 和 10 位碱基之间, 即 *PpARF8* 的 2 441 位碱基处(图 6)。另外, 在桃果实发育的 4 个时期, miR167a 对 *PpARF8* 的裂解频度存在显著差异(表 4), 其中二者间的裂解频度在花后 20 和 90 d 时较低。在花后 75 d 时作用强度最大, 表明 miR167a 可能在桃果实发育的第二次迅速生长期(花后 75 d)起主要调节作用。

2.6 生长素处理对桃 ppe-miR167a、靶基因 *PpARF8* 及裂解产物表达的影响

上述降解组结果表明 ppe-miR167a 的主效靶基因为生长素应答因子 *PpARF8*, 已知生长素通过与应答因子(ARF)结合影响植物的生长发育, 因此为



不同小写字母代表 3 个基因在不同发育时期表达量的显著性差异 ($P < 0.05$)

图 5 果实不同发育阶段 *PpARF6*、*PpARF8* 及 *PpARF6-like* 的相对表达

Different normal letters represent the significant differences of the expression levels of three genes in different development periods ($P < 0.05$)

Fig. 5 Relative expression of *PpARF6*, *PpARF8* and *PpARF6-like* in different stages of peach fruits

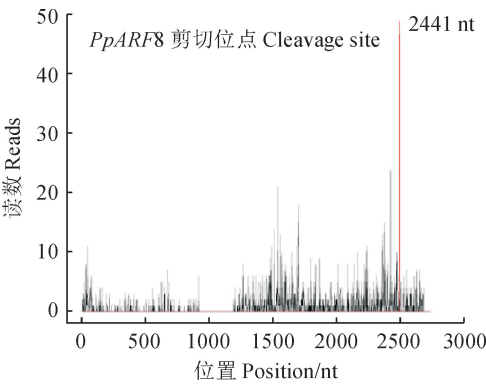


图 6 ppe-miR167a 与 *PpARF8* 间的作用方式及作用位点鉴定

Fig. 6 The mode and site of action between ppe-miR167a and *PpARF8* were identified by degradome sequencing

表 4 降解组测序鉴定的 ppe-miR167a 的靶基因信息
Table 4 Information of the target genes of ppe-miR167a identified by degradome sequencing

项目 Item	ppe-miR167a	
	Prupe. 3G011800_v2. 0. a1	Prupe. 7G264000_v2. 0. a1
基因 Gene	<i>PpARF8</i>	<i>HPR-A</i>
匹配位置 Alignment range	2 430~2 451	351~372
裂解位点 Degradome cleavage site	2 441	363
DPA20-TPB	1 845. 03	18. 83
DPA50-TPB	4 502. 33	0
DPA75-TPB	12 663. 61	15. 83
DPA90-TPB	1 793. 64	44. 84

注:TPB. 每 10 亿的某转录本数
Note:TPB. Transcripts per billion

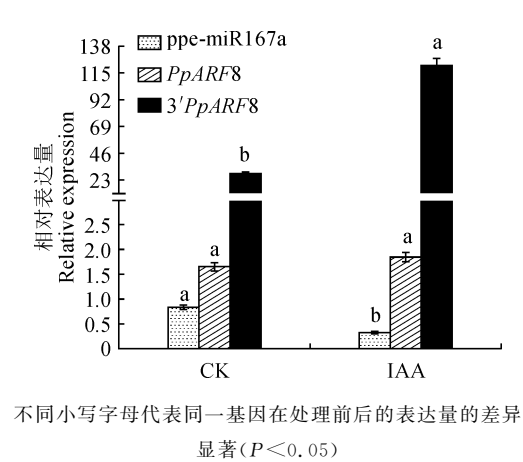


图 7 IAA 处理后 ppe-miR167a 与其靶基因及靶基因 3' 端裂解产物的表达

Different normal letters represent the significant differences of the expression levels of the same gene with treatments ($P<0.05$)
Fig. 7 Expression patterns of ppe-miR167a, ARF8 and cleavage product of peach ARF8 3' end with IAA treatment and the control fruits

解析 ppe-miR167a 参与生长素信号调控果实发育的功能,本研究在果实发育后期用外源 IAA 处理 30 d,对果实中 ppe-miR167a 及其靶基因的空间表达进行了分析,同时也分析了二者间裂解产物表达量的变化。结果表明,果实发育后期生长素处理后,处理组中 ppe-miR167a 的表达量低于对照组,而其靶基因 *PpARF8* 以及 3' 端裂解产物的表达在处理组中均高于对照组(图 7)。由以上结果可以看出,生长素处理能在一定程度上影响 ppe-miR167a 及其靶基因 *PpARF8* 的表达以及二者间的作用频度。

3 讨论

目前的报道已经证明 ARF 转录因子为生长素

信号通路中的关键因子,直接参与生长素信号,在植物果实成熟过程中发挥重要作用^[18-21]。本项目组前期的研究发现 ppe-miR167a 的靶基因为生长素响应因子 ARFs 家族成员,为研究二者间的作用关系及它们在桃果实发育过程中可能存在的作用,我们首先验证了 miR167a 在‘小白凤’品种中的精确序列,结果表明, ppe-miR167a 的序列在不同品种间存在一定的碱基差异^[12],且差异碱基发生在序列的两端,这与早期其他植物中的研究结果一致^[22]。分析 ppe-miR167a 在不同发育时期桃果实中的表达情况发现 miR167a 在果实快速膨大期和果实成熟期表达量较高,而在果实硬核期表达量较低,这与杂柑品种‘清见’中 miR167a 的表达量在果实发育前中期相对较高而后期较低有所不同^[11]。3 个 ARFs 基因的空间表达结果显示 *PpARF8* 与 ppe-miR167a 的表达趋势基本一致, *PpARF6* 和 *PpARF6-like* 的表达与 ppe-miR167a 的表达无明显相关性,这与早期研究报道的 miRNA 与靶基因的表达一般呈负相关不同^[23]。拟南芥中的研究发现,miR167 与其靶基因 *AtARF6* 和 *AtARF8* 间存在反馈调节作用, *AtARF6* 能激活 miR167 表达, *AtARF8* 抑制 miR167 表达,它们之间通过彼此激活或抑制作用来调控不定根的形成^[24]。在甜橙果实成熟过程中即花后 170~250 d, *CiARF8* 的表达量明显下调,在花后 250 d 的表达量保持在一个较低的水平^[25],这与本研究中 *PpARF8* 在桃不同发育时期果实中的表达也存在一定差异。

为验证预测靶基因的真实性及 ppe-miR167a 与 ARFs 基因间的作用模式,我们通过降解组测序进行了分析,结果表明仅 *PpARF8* 上存在 miR167a

的裂解位点,说明生物信息学预测结果存在一定的误差,可能是预测时参数设置问题导致了一定的假阳性结果。降解组结果显示 ppe-miR167a 作用于靶基因 *PpARF8* 的裂解位点位于 miR167a 5' 端的第 9 和 10 位碱基之间,这与早期报道的 miRNA 裂解靶基因的位点大多位于 miRNA 5' 端的第 10 和 11 个碱基之间有所不同^[26-27],说明 miRNA 对其靶基因的裂解位点既有一定的保守性,又存在一定的多样性^[28-30]。降解组结果显示 3' 端裂解产物的表达与对应 ppe-miR167a 的表达趋势不一致,这之前研究者在桃及其他物种中推测的 miRNA 表达量可能与靶基因表达趋势相反而与 3' 端裂解产物的表达趋势一致的情况存在差异^[13, 31],这可能是 miRNA 在转录和转录后水平参与了植物发育的多个过程,其不仅对靶向的 mRNA 起作用,同时也可以和其他的 RNAs 相互作用调控其自身或其他的竞争性内源 RNA^[32-33]。

已有的报道表明 *AtARF4*, *AtARF5*, *AtARF16*, *AtARF19*, *OsARF1* 和 *OsARF23* 在生长素处理后,转录物的表达量有所增加^[34-37]。*FvARF* 响应生长素处理^[38], *SlARF2* 转录物积累量明显受生长素和赤霉素的正调控^[39]。目前,研究最多的生长素

是 IAA^[40],但 miR167 靶向 *ARFs* 基因对 IAA 处理的响应分析还未见报道。王少希等通过外源 IAA 处理^[21],研究了不同浓度和不同 IAA 处理时间对 *FvARFs* 表达的影响,结果表明外源 IAA 处理后所有 *FvARFs* 的表达均增加,并在处理 6 h 或 12 h 达到峰值,但其未对 miR167 的表达进行分析。本研究中外源 IAA 处理桃果实 30 d 后定量表达结果显示,miR167a 的表达量在处理组中低于对照组, *PpARF8* 及 3' 端裂解产物的表达在处理组中均高于对照组, *PpARF8* 在 IAA 处理后的表达变化情况与王少希等^[21]的研究结果一致。由此可知,外源生长素处理能在一定程度上影响了 miR167a 和 *PpARF8* 的表达以及二者间的裂解作用频度,但未表现出之前研究者推测的 miRNA 表达量可能与靶基因表达趋势相反而与 3' 端裂解产物的表达趋势一致的现象,这一情况推测可能是 miRNA 和靶基因在植物的生长发育中不止在一个代谢过程中起作用,它们可能参与了植物生长发育的多个方面,受多种因素调控。综上,桃果实中 ppe-miR167a 可以通过介导其靶基因 *PpARF8* 的裂解影响生长素信号途径参与果实发育的调控,但其调控机理及作用通路还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADS M W, *et al.* MicroRNAs in plants [J]. *Genes Dev*, 2002, **16**(13): 1 616-1 626.
- [2] KALLURI U C, DIFAZIO S P, BRUNNER A M, *et al.* Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, **7**(1): 59.
- [3] TIWARI S B, HAGEN G, GUILFOYLE T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(2): 533-543.
- [4] 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): 4 211-4 218.
- [5] MALLORY A C, BARTEL D P, BARTEL B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes [J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(5): 1 360-1 375.
- [6] LIU N, WU S, HOUTEN J V, *et al.* Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8 by microRNA167 leads to floral development defects and female sterility in tomato [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(9): 2 507-2 520.
- [7] HENDELMAN A, BUXDORF K, STAV R, *et al.* Inhibition of *Lamina* outgrowth following *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (*SlARF10*) derepression [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, **78**(6): 561-576.
- [8] 韦 懿, 陈志辉, 陈国兴, 等. 超量表达水稻 miRNA167a 调控株型的研究 [J]. 分子植物育种, 2011, **9**(4): 390-396.
- [9] WEI Y, CHEN Z H, CHEN G X, *et al.* Study of overexpressing miRNA 167a to regulate the architecture in *Oryza sativa* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, **9**(4): 390-396.
- [10] XU X B, MA X Y, LEI H H, *et al.* MicroRNAs play an important role in the regulation of strawberry fruit senescence in low temperature [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, **108**: 39-47.
- [11] GLAZIŃSKA P, WOJCIECHOWSKI W, WILMOWICZ E, *et al.* The involvement of InMIR167 in the regulation of expression of its target gene *InARF8*, and their participation in the vegetative and generative development of *Ipomoea nil* plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**(3-4): 225-234.
- [12] 罗近予, 荣 毅, 熊博, 等. 清见果实发育成熟过程中 miR167 及其靶基因 *ARF8* 的动态表达分析 [J]. 分子植物育种, 2018, **16**(22): 7 264-7 269.
- [13] LUO J Y, RONG Y, XIONG B, *et al.* Dynamic expression analysis of miR167 and its target gene *ARF8* during fruit development and maturation of kiyomi tangor [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, **16**(22): 7 264-7 269.

- [12] ZHANG Y P, BAI Y H, HAN J, *et al.* Bioinformatics prediction of miRNAs in the *Prunus persica* genome with validation of their precise sequences by miR-RACE[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, **170**(1): 80-92.
- [13] ZHANG Y P, HAN J, YU M L, *et al.* Characterization of target mRNAs for *Prunus persica* microRNAs using an integrated strategy of PLM-RACE, PPM-RACE and qRT-PCR[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 170: 8-16.
- [14] SUN X, ZHANG Y P, ZHU X D, *et al.* Advances in identification and validation of plant microRNAs and their target genes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, **152**(2): 203-218.
- [15] TONG Z G, GAO Z H, WANG F, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71.
- [16] SHI R, CHIANG V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. *BioTechniques*, 2005, **39**(4): 519-525.
- [17] 张彦苹, 孙峭岩, 杜奕承, 等. 外源 IAA 处理对桃果实中内源激素含量的影响[J]. 北方园艺, 2019, (21): 33-38.
ZHANG Y P, SUN Q Y, DU Y C, *et al.* Effects of exogenous IAA treatment on endogenous hormone content in peach fruit[J]. *Northern Horticulture*, 2019, (21): 33-38.
- [18] HAO Y W, HU G J, BREITEL D, *et al.* Auxin response factor *SLARF2* is an essential component of the regulatory mechanism controlling fruit ripening in tomato[J]. *PLOS Genetics*, 2015, **11**(12): e1005649.
- [19] DE JONG M, WOLTERS-ARTS M, FERON R, *et al.* The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SLARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development[J]. *Plant Journal*, 2009, **57**(1): 160-170.
- [20] LIU K D, YUAN C C, LI H L, *et al.* Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in *Papaya* (*Carica papaya* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 901.
- [21] 王少希. 草莓 ARF 基因家族的生物信息学分析及 MIR167 与靶基因 ARF6 的功能鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [22] FENSELAU DE FELIPPES F, SCHNEEBERGER K, DE-ZULIAN T, *et al.* Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences[J]. *RNA*, 2008, **14**(12): 2 455-2 459.
- [23] 张彦苹, 刘照坤, 朱旭东, 等. 桃果实中 miR393b 靶向生长素受体基因 TIR1 的作用机制分析[J]. 植物生理学报, 2018, **54**(5): 755-762.
ZHANG Y P, LIU Z K, ZHU X D, *et al.* The interactive mode analysis between miR393b and its target gene TIR1 in peach fruit[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, **54**(5): 755-762.
- [24] GUTIERREZ L, BUSSELL J D, PACURAR D I, *et al.* Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of auxin response factor transcripts and microRNA abundance[J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(10): 3 119-3 132.
- [25] 李斯贝. 柑橘生长素响应因子 ARF 基因家族的表达分析及功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [26] ELBASHIR S M. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes & Development*, 2001, **15**(2): 188-200.
- [27] HUTVAGNER G. A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA[J]. *Science*, 2001, **293**(5 531): 834-838.
- [28] AUKERMAN M J, 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): 2 730-2 741.
- [29] PALATNIK J F, ALLEN E, *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J]. *Nature*, 2003, **425**(6 955): 257-263.
- [30] WANG C, SHANGGUAN L F, KIBET K N, *et al.* Characterization of microRNAs identified in a table grapevine cultivar with validation of computationally predicted grapevine miRNAs by miR-RACE[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(7): e21259.
- [31] 王梦琦, 解振强, 孙 欣, 等. 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): 1 061-1 072.
WANG M Q, XIE Z Q, SUN X, *et al.* Function analysis of miR159 and its target gene VvGAMYB in grape flower development[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, **44**(6): 1 061-1 072.
- [32] FRANCO-ZORRILLA J M, VALLI A, TODESCO M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity[J]. *Nature Genetics*, 2007, **39**(8): 1 033-1 037.
- [33] LE T D, ZHANG J P, LIU L, *et al.* Computational methods for identifying miRNA sponge interactions[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2018, **18**(4): 577-590.
- [34] WANG D K, PEI K M, FU Y P, *et al.* Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Gene*, 2007, **394**(1-2): 13-24.
- [35] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE P J, ARIMA K, *et al.* Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19[J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(2): 444-463.
- [36] GARCIA D, COLLIER S A, BYRNE M E, *et al.* Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the trans-acting siRNA pathway[J]. *Current Biology*, 2006, **16**(9): 933-938.
- [37] NAGPAL P. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation[J]. *Development*, 2005, **132**(18): 4 107-4 118.
- [38] XING H Y, PUDAKE R N, GUO G G, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 178.
- [39] REN Z X, LIU R Y, GU W T, *et al.* The *Solanum lycopersicum* auxin response factor *SLARF2* participates in regulating lateral root formation and flower organ senescence[J]. *Plant Science*, 2017, 256: 103-111.
- [40] SHIMIZU-MITAO Y, KAKIMOTO T. Auxin sensitivities of all *Arabidopsis* Aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, **55**(8): 1 450-1 459.