

西瓜 miR164b 靶基因鉴定及其对黄瓜绿斑驳花叶病毒侵染应答的分析

孙玉燕, 何艳军, 牛晓伟, 崔狄, 范敏*

(浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021)

摘要: 将 miR164b 序列与西瓜基因组进行比对, 获得 miR164b 前体 Pre-miR164b 基因并克隆。Pre-miR164b 长度为 97 bp, 含有完整的茎环结构。Pre-miR164b 启动子区含有光响应元件、赤霉素响应元件、乙烯响应元件、水杨酸响应元件、真菌诱导响应元件等多个顺式作用元件。降解组测序获得 miR164b 的 4 个靶基因, 均注释为 NAC 转录因子基因, 剪切位点位于 miR164b 序列 5' 端第 10 位碱基。miR164b 及靶基因在黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 侵染不同时间的表达模式不同, 靶基因 Cla018596 的表达模式与 miR164b 呈负相关, 而 Cla019099、Cla023219 和 Cla023357 的表达模式与 miR164b 没有相关性。

关键词: 西瓜; miR164; NAC; 降解组测序; 表达模式

中图分类号: S 651

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 03-0482-11

Identification of the Targets of miR164b and Their Response to *Cucumber green mottle mosaic virus* Infection in Watermelon

SUN Yuyan, HE Yanjun, NIU Xiaowei, CUI Di, and FAN Min*

(Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The precursor gene of miR164b, Pre-miR164b, was obtained through blast of miR164b and the watermelon genome. Pre-miR164b, with a length of 97 bp, was able to form the stem-loop structure. The promoter of Pre-miR164b contains several *cis*-acting regulatory elements, such as light responsive element, gibberellin responsive element, ethylene responsive element, salicylic acid responsive element, and fungal elicitor responsive element. Four target genes of miR164b, annotated as NAC transcription factor, were predicted and the cleavage site was located at the 10th of miR164b at the 5' end. Expression patterns of miR164b and NAC were different during the process of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) infection. Expression of Cla018596 was negatively correlated with miR164b. However, the expression of Cla019099, Cla023219 and Cla023357 was not correlated with miR164b.

Keywords: watermelon; miR164; NAC; degradome sequencing; expression pattern

收稿日期: 2017-11-02; **修回日期:** 2018-01-08

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2016M601973); 浙江省自然科学基金项目 (LQ18C150002); 国家自然科学基金项目 (31572145); 浙江省蔬菜新品种选育重大科技专项子课题 (2016C02051-4-2); 浙江省农业科学院青年人才培养项目 (2017R23R08E01)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fanminfm@sina.com)

miRNA 是长度为 19~25 nt 调控基因表达的内源小 RNA, 2002 年首次在植物中发现(Reinhart et al., 2002)。成熟 miRNA 的形成涉及多个生物过程, 需要多个进化保守蛋白家族的参与(Rogers & Chen, 2013)。植物 miRNA 的主要作用机制是其介导的靶基因切割。大多数植物 miRNA 能够将其完全互补或接近完全互补的靶基因序列进行切割, 试验证明这类切割精确地发生在 miRNA 配对碱基的第 10 或 11 位(Llave, 2004)。miRNA 在植物生长发育和抗逆应答中起着重要作用。逆境条件下, 植物通过调控 miRNA 的表达, 作用于相应的靶基因来提高植物对胁迫的抗性(Khraiweh et al., 2012)。

miR164 是植物中较为保守的一类 miRNA 家族。近年来, 关于 miR164 调控植物对病毒胁迫应答的研究取得了一定进展。受烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的侵染, 烟草中 miR164 的表达被诱导(Bazzini et al., 2007)。miR164 在芜菁黄化花叶病毒(*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV)侵染后表达被诱导, 在转病毒沉默抑制蛋白基因 *PI/HC-Pro* 的拟南芥植株中, miR164 的表达同样被诱导(Kasschau et al., 2003)。

miR164 主要调控 NAC 转录因子(NAM、ATAF1/2 和 CUC2)的表达(Nikovics et al., 2006; Phookaew et al., 2014; Zhu et al., 2015)。在拟南芥中, miR164 靶向 5 个编码 NAC 结构域的基因 *NAC1*、*CUC1*、*CUC2*、*At5g07680* 和 *At5g61430* (Mallory et al., 2004)。拟南芥 miR164 通过介导 *NAC1* mRNA 的切割调控生长素信号, 进而促进侧根的形成(Xie et al., 2000; Guo et al., 2005); miR164 通过调控 *CUC1* 和 *CUC2* 的表达影响拟南芥分生组织的发育和气生器官的分离(Laufs et al., 2004; Baker et al., 2005)。此外, miR164 与 NAC 结合还可调控植物胚胎和花的形成(Larue et al., 2009)、衰老(Kim et al., 2009)、协助 mRNA 在韧皮部运输(Kehr & Buhtz, 2007)等。

除调控植物生长发育外, miR164 及靶基因 *NAC* 参与植物对胁迫的应答。拟南芥中, TMV 和油菜花叶病毒(*Oilseed rape mosaic virus*, ORMV)侵染可提高 miR164a 启动子的转录活性(Bazzini et al., 2009)。马铃薯 *StNAC* 和拟南芥 *ATAF1*、*ATAF2* 的表达在病原菌侵染和受伤后被诱导(Collinge & Boller, 2001)。双生病毒 DNA 复制蛋白 RepA 与两个 NAC 蛋白 GRAB1 和 GRAB2 互作(Xie et al., 1999)。在油菜中, NAC 在虫害、核盘菌侵染、冷害和干旱等胁迫后呈现差异表达, 其中 *BnNAC14* 与 *BnNAC85* 相互作用(Hegedus et al., 2003)。

本课题组前期通过对黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)侵染前后的西瓜自交系材料‘JJZ-M’进行 miRNA 高通量测序, 发现 miR164b 在病毒侵染后呈现抑制表达(Sun et al., 2017)。本研究从‘JJZ-M’中分离并克隆 miR164b 的前体基因, 分析其启动子区的顺式作用元件, 同时对 miR164b 的靶基因及其剪切位点进行鉴定, 对不同接种时间的表达模式进行分析, 为进一步了解 miR164b 及靶基因对 CGMMV 胁迫应答的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为西瓜(*Citrullus lanatus*)高代自交系‘JJZ-M’。2017 年 3 月播种于浙江省农业科学院玻璃温室, 温度控制在 25℃。取发病叶片和磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)按 1:5 的比例混合, 研磨成糊状病毒汁液。取两片真叶期待接种的植株, 在叶面散上金刚砂, 蘸取少量病毒汁液轻轻摩擦叶面 2~3 次, 清水冲去多余的金刚砂。分别于接种后 0、1、6、18、24 和 48 h 取样, 3 株混成 1 个样品重复, 3 次生物学重复。RNAiso 试剂(TaKaRa)提取总 RNA 备用。

1.2 miR164b 前体基因预测及分子克隆

根据课题组前期 miRNA 高通量测序结果, miR164b (TGGAGAAGCAGGGCACGTGC) 在 CGMMV 侵染西瓜叶片后呈现抑制表达 (Sun et al., 2017)。利用 Blastn ($E\text{-value} = 1e^{-2}$) 将 miR164b 序列与西瓜基因组数据 (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/genome/index.cgi?organism=watermelon>) 进行比对, 获得与 miR164b 成熟序列完全匹配的基因组序列。截取 miR164b 两端 150 nt 的核苷酸序列, 采用 RNA Structure 3.2 软件进行分析, 若其存在完整的茎环结构且成熟序列完全位于 5' 端, 则预测该茎环结构对应的核苷酸序列为 miR164b 的前体 Pre-miR164b。

根据 pre-miR164b 茎环结构的基因组序列, 设计特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL , 包含 2 μL 10 \times PCR 缓冲液 (Mg^{2+} Plus)、1.5 μL dNTPs 混合液 ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、0.5 μL rTaq ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、上游和下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、2 μL DNA、13.0 μL ddH₂O。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 与 pEASY-T1 载体连接进行 T/A 克隆, 热击法转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态细胞, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 过夜摇菌, 测序。

1.3 miR164b 前体基因序列比对和启动子区顺式作用元件分析

将 miR164b 前体与 miRbase 21.0 中其他物种 miRNA 的前体序列进行 blast 比对, 并利用 MEGA 5.1 软件 Neighbor-Joining (测试方法选用 Bootstrap, 重复次数设为 2 000) 构建 miR164b 前体与其他物种 miR164 前体的进化树。

分离 miR164b 前体上游 1 500 bp 的序列, 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件对其所包含的顺式作用元件进行预测和分析 (Lescot et al., 2002)。

1.4 降解组文库构建、测序及数据分析

采集对照和 CGMMV 侵染 48 h 的西瓜叶片, 分别提取总 RNA, 等量混合。磁珠捕获 mRNA, 3' 和 5' 接头连接; 生物酰化随机引物与 mRNA 混合反转录; PCR 扩增, 完成整个文库制备。构建好的文库用 Hiseq 2500 测序平台 (Illumina, USA) 进行测序, 测序读长为单端 50 bp。

测序获得的原始数据通过数据处理得到可用于后续分析的可比对测序序列。将可比对序列与西瓜的 cDNA 数据库序列比对生成降解组密度文件。通过 Target finder 靶基因预测软件预测出与西瓜 miRNA 序列配对的靶基因 mRNA 序列。将预测的 miRNA 对应的靶基因和生成降解组密度文件中的 mRNA 进行结合运算, 找出共同具有的 mRNA, 该 mRNA 即为 miRNA 的靶基因。给出降解组的峰值分类和分值, 对产生的预测结果进行 t-plots 作图。

1.5 miR164b 及其靶基因的表达分析

利用 poly (T) 加尾 RT-PCR (Shi & Chiang, 2005) 分析 miR164b 的表达。将约 2 μg 总 RNA 利用 TransScript Green miRNA Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒 (全式金) 进行 Poly (A) 加尾, 然后利用含有 oligo-dT 的通用接头引物 (表 1) 将带有 Poly (A) 尾巴的 miRNA 反转录成 cDNA, 以 U6 snRNA 作为内参。靶基因的表达分析: 利用 Trans Script One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (全式金) 将总 RNA 反转录成 cDNA, 以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参基因。qRT-PCR 使用 TransStart Top Green qPCR Supermix 试剂盒 (全式金)。qRT-PCR 在 StepOne Plus Real-Time PCR System (ABI) 中完成。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 次循环。3 次生物学重复。试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

表 1 所用引物及序列
Table 1 Primers and sequences used in this study

用途 Usage	引物名称 Primer name	正向序列 (5' - 3') Forward sequence	反向序列 (5' - 3') Reverse sequence
前体基因克隆 Precursor gene cloning	Pre-miR164b	AGAGAGGCATGTTGGAG	CGAGAGAATCCTGCTGGAG
内参基因 Reference gene	<i>U6</i>	GGGGACATCCGATAAAATT	TGTGCGTGTATCCTTGC
	<i>β-actin</i>	CCATGTATGTTGCCATCCAG	GGATAGCATGGGGTAGAGCA
qRT-PCR	qPCR-miR164b	TTCCTTTGGAGAAGCAGGGCACGTGC	GTGCAGGGTCCGAGGT
	qPCR-Cla018596	AGTTCACATTCTGGGTTAGT	TTTGGGTAAGGTTCTTTGAGT
	qPCR-Cla023219	TCGTCGCCTCGTCATCGT	AGGGCACTTGCTCATACTCATT
	qPCR-Cla023357	TGGTAGAGCCATTGCTGAAGT	GCTCGGTTCGTTCCGAGCA
	qPCR-Cla019099	TGGCTTCTTCTTACAATACTTC	GGTCTGATTGGCGGTGA

2 结果与分析

2.1 miR164b 前体基因预测及克隆

将 miR164b 成熟序列与西瓜基因组数据库进行 Blastn 序列比对, 获得与 miR164b 序列完全匹配的 4 条基因组序列, Chr3: 28186483... 28186464、Chr4: 18094484..1809446、Chr9: 4409186...44091675 和 Chr10: 28130986...8131005。其中 Chr3: 28186483...28186464 及其上、下游序列能够形成完整茎环结构且符合植物 miRNA 的前体特征。

以西瓜基因组 DNA 为模板对 miR164b 的前体基因进行 PCR 扩增 (图 1)。

回收片段进行克隆测序分析, miR164b 的前体长度为 97 bp, 能形成稳定的茎环结构, 推测这个茎环结构对应的核苷酸序列为 miR164b 的前体 Pre-miR164b (图 2)。

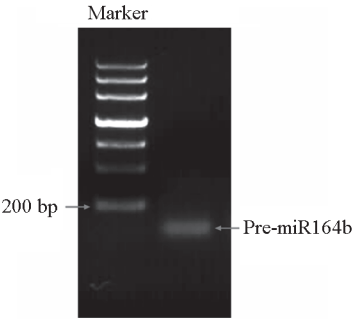


图 1 Pre-miR164b PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of Pre-miR164b

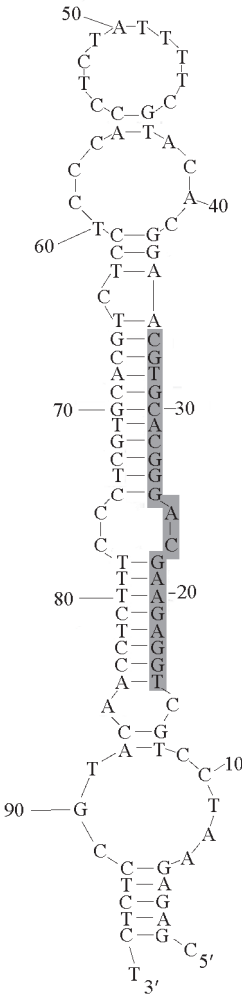


图 2 Pre-miR164b 形成的茎环结构
Fig. 2 Stem-loop structure of Pre-miR164b

2.2 miR164b 前体基因序列比对及系统进化分析

将 Pre-miR164b 与 miRbase 21.0 中 miRNA 的前体基因序列进行 blast 比对, 发现 Pre-miR164b 序列含有两个保守区域, 分别为成熟 miR164b 序列及其反向互补序列 (图 3)。

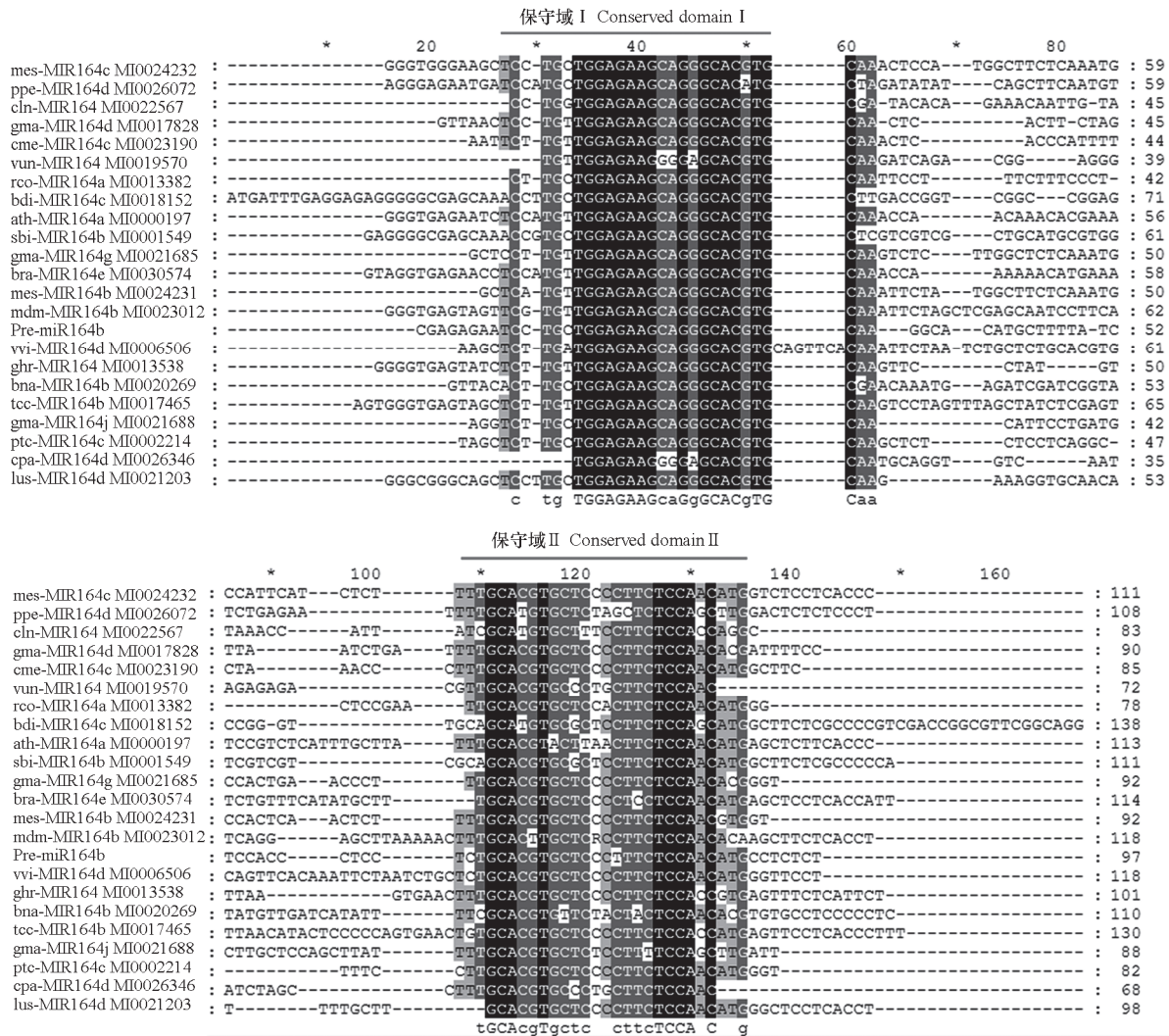


图 3 Pre-miR164b 与其他物种序列比对

mes: 木薯; ppe: 桃; cln: 杉木; gma: 大豆; cme: 甜瓜; vun: 豇豆; rco: 蓖麻; bdi: 二穗短柄草; ath: 拟南芥; sbi: 高粱; bra: 大白菜; mdm: 苹果; vvi: 葡萄; ghr: 棉花; bna: 油菜; tcc: 可可; ptc: 杨树; cpa: 木瓜; lus: 亚麻。

Fig. 3 Sequence alignment analysis of Pre-miR164b in watermelon and other species

mes: *Manihot esculenta*; ppe: *Prunus persica*; cln: *Cunninghamia lanceolata*; gma: *Glycine max*; cme: *Cucumis melo*; vun: *Vigna unguiculata*; rco: *Ricinus communis*; bdi: *Brachypodium distachyon*; ath: *Arabidopsis thaliana*; sbi: *Sorghum bicolor*; bra: *Brassica rapa*; mdm: *Malus × domestica*; vvi: *Vitis vinifera*; ghr: *Gossypium hirsutum*; bna: *Brassica napus*; tcc: *Theobroma cacao*; ptc: *Populus trichocarpa*; cpa: *Carica papaya*; lus: *Linum usitatissimum*.

选取不同物种 miRNA 前体序列进行系统进化分析, 其中 Pre-miR164b 序列与蓖麻 rco-MIR164a (MI0013382) 的亲缘关系最近 (图 4)。

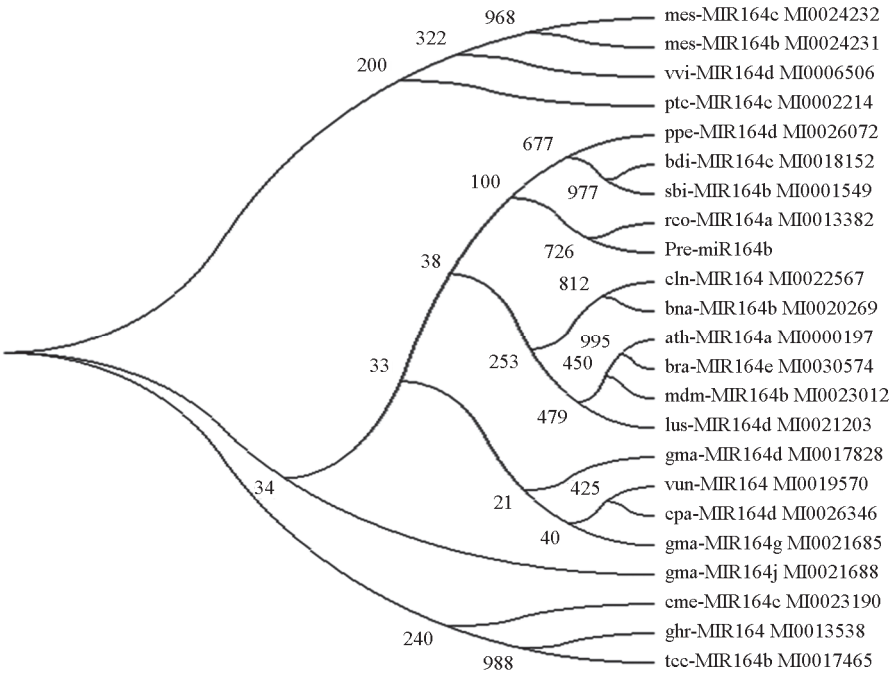


图 4 Pre-miR164b 的系统进化分析

mes: 木薯; ppe: 桃; cln: 杉木; gma: 大豆; cme: 甜瓜; vun: 豇豆; rco: 蓖麻; bdi: 二穗短柄草; ath: 拟南芥; sbi: 高粱;
bra: 大白菜; mdm: 苹果; vvi: 葡萄; ghr: 棉花; bna: 油菜; tcc: 可可; ptc: 杨树; cpa: 木瓜; lus: 亚麻。

Fig. 4 Phylogenetic relationship analysis of Pre-miR164b

mes: *Manihot esculenta*; ppe: *Prunus persica*; cln: *Cunninghamia lanceolata*; gma: *Glycine max*; cme: *Cucumis melo*; vun: *Vigna unguiculata*;
rco: *Ricinus communis*; bdi: *Brachypodium distachyon*; ath: *Arabidopsis thaliana*; sbi: *Sorghum bicolor*; bra: *Brassica rapa*;
mdm: *Malus × domestica*; vvi: *Vitis vinifera*; ghr: *Gossypium hirsutum*; bna: *Brassica napus*; tcc: *Theobroma cacao*;
ptc: *Populus trichocarpa*; cpa: *Carica papaya*; lus: *Linum usitatissimum*.

2.3 miR164b 前体基因启动子区顺式作用元件分析

对 Pre-miR164b 上游 1 500 bp (Chr3: 28184901..28186400) 的启动子区所含的顺式作用元件进行分析, 发现其含有多个顺式作用元件 (表 2)。

表 2 Pre-miR164b 启动子区顺式作用元件分析
Table 2 Analysis of Pre-miR164b promoter and its cis-acting regulatory elements

功能 Function	元件名称 Motif name	物种 Species	位置/正 (反) 义链 Position/strand	序列 Sequence
光响应元件 Light responsive element	3-AF1 binding site	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	1 119 (-)	AAGAGATATTT
高转录水平顺式作用元件 cis-acting element conferring high transcription levels	5UTR Py-rich stretch	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1 416 (-)	TTTCTTCTCT
厌氧诱导必需顺式作用元件 cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	ARE	玉米 <i>Zea mays</i>	1 114 (-)	TGGTTT
富含 AT DNA 结合蛋白的结合位点 Binding site of AT-rich DNA binding protein	AT-rich element	大豆 <i>Glycine max</i>	1 240 (+)	ATAGAAATCAA
部分光响应模块 Part of a light responsive module	AT1-motif	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	105 (+) 1 020 (+)	AATTATTTTTTATT ATTAATTTTACA

续表 2

功能 Function	元件名称 Motif name	物种 Species	位置/正(反)义链 Position/strand	序列 Sequence
部分参与光响应的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	ATCT-motif	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	141 (+)	AATCTAATCT
部分参与光响应的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	Box 4	香芹 <i>Petroselinum crispum</i>	215 (+) 881 (-) 770 (-)	ATTAAT ATTAAT ATTAAT
光响应元件 Light responsive element	Box I	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	1 020 (-) 733 (+) 973 (-)	ATTAAT TTTCAAA TTTCAAA
真菌诱导响应元件 Fungal elicitor responsive element	Box-W1	香芹 <i>Petroselinum crispum</i>	991 (-) 1 437 (-)	TTGACC TTGACC
启动子和增强子区的普通顺式作用元件 CAAT-box Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions		拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> 大豆 <i>Glycine max</i>	91 (+) 92 (+) 994 (+) 429 (-)	CCAAT CAATT CAATT CAATT
		大麦 <i>Hordeum vulgare</i> 芜菁 <i>Brassica rapa</i>	430 (-) 927 (+) 969 (+) 133 (-)	CAAT CAAT CAAAT CAAAT
乙烯响应元件 Ethylene-responsive element	ERE	康乃馨 <i>Dianthus caryophyllus</i>	732 (+)	ATTTCAAA
参与光响应的顺式作用元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	G-box	玉米 <i>Zea mays</i>	384 (-)	CACGTT
部分光响应元件 Part of a light responsive element	GA-motif	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	160 (+)	AAAGATGA
部分光响应模块 Part of a light responsive element	GAG-motif	菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	1 416 (+)	AGAGATG
赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	GARE-motif	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	616 (+)	AAACAGA
光响应元件 Light responsive element	GT1-motif	燕麦 <i>Avena sativa</i> 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	885 (-) 1 385 (+) 886 (-)	GGTTAAT GGTTAA GGTTAA
参与热胁迫响应的顺式作用元件 <i>cis</i> -acting element involved in heat stress responsiveness	HSE	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	310 (+) 727 (+) 498 (+) 928 (+)	AAAAAATTTTC AAAAAATTTTC AAAAAATTTTC AAAAAATTTTC
部分光响应元件 Part of a light responsive element	I-box	黄菊 <i>Flaveria trinervia</i>	821 (-)	GATATGG
部分光响应元件 Part of a light responsive element	LAMP-element	菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	1111 (+)	CCAAAACCA
参与类黄酮生物合成基因调控的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation	MBSI	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	887 (-)	aaaAaaC(G/C)GTTA
参与光响应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness	MRE	香芹 <i>Petroselinum crispum</i>	1 341 (+)	AACCTAA
胚乳表达必需顺式作用元件 <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression	Skn-I_motif	水稻 <i>Oryza sativa</i>	164 (-) 436 (-) 376 (+)	GTCAT GTCAT GTCAT
转录起始区的核心启动子元件 Core promoter element around - 30 of transcription start	TATA-box	油菜 <i>Brassica napus</i> 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	10 (+) 11 (+) 13 (+) 29 (+)	ATATAT TATA TATTTAAA TAATA
参与水杨酸响应的顺式作用元件 <i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness	TCA-element	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	827 (+) 890 (+)	CCATCTTTT CCATCTTTT
部分光响应元件 Part of a light responsive element	TCT-motif	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i> 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1 457 (+) 1 492 (-)	GAGAAGAATA TCTTAC

包括基因启动子和增强子区的顺式作用元件 (TATA-box 和 CAAT-box), 光响应元件 (3-AF1 binding site、AT1-motif、ATCT-motif、TCT-motif、AT-rich element、ATCT-motif、G-box、LAMP-element、I-box、GA-motif、GAG-motif、Box I、Box 4、GT1-motif 和 MRE), 赤霉素响应元件 (GARE-motif), 乙烯响应元件 (ERE), 水杨酸响应元件 (TCA-element), 真菌诱导响应元件 (Box-W1), 热激响应元件 (HSE), 胚乳表达调控元件 (Skn-1-motif), 类黄酮生物合成基因调控元件 (MBSI) 等。由此可以预测, miR164b 可能参与调控植物的生长发育、次生代谢产物合成和逆境胁迫应答等多个生理过程。

2.4 降解组测序鉴定 miR164b 的靶基因

通过降解组测序对 miR164b 的靶基因进行鉴定, 获得 miR164b 的 4 个靶基因, 分别为 Cla018596、Cla019099、Cla023219 和 Cla023357, 均注释为 NAC 转录因子基因。剪切位点位于 miR164b 5'端的第 10 位碱基, 分别位于靶基因 Cla018596、Cla019099、Cla023219 和 Cla023357 的第 643、646、643 和 778 位碱基 (图 5)。

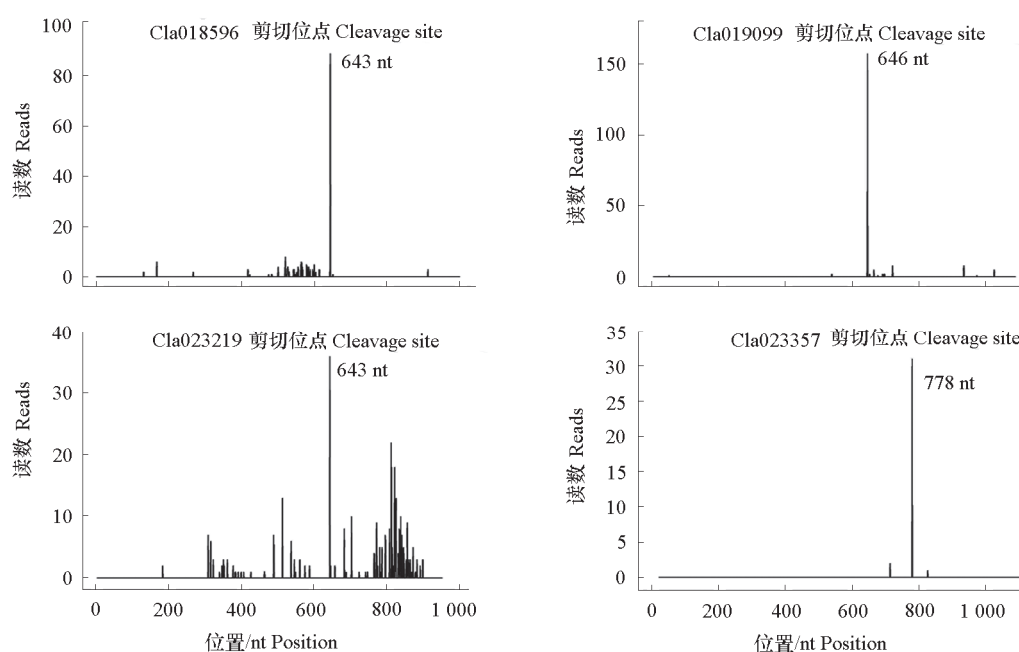


图 5 降解组测序鉴定 miR164b 的靶基因及其剪切位点

Fig. 5 Target genes of miR164b and cleavage sites predicted by degradome sequencing

2.5 miR164b 及靶基因在 CGMMV 侵染不同阶段的表达分析

如图 6 所示, miR164b 在 CGMMV 侵染 1 h 的表达量显著升高, 随后逐渐下降, 在 48 h 的表达量最低。靶基因 Cla018596 在 CGMMV 侵染 1 h 的表达量显著下降, 6 ~ 48 h 逐渐上升; Cla019099 在 CGMMV 侵染 6 h 的表达量显著上升, 在 18 h 下降, 24 和 48 h 上升; Cla023219 在 CGMMV 侵染 0 h 的表达量最高, 在 1 ~ 18 h 显著降低, 24 h 升高, 48 h 显著降低; Cla023357 在 CGMMV 侵染 0 ~ 6 h 的表达量下降, 在 18 h 显著上升, 之后下降。由上述结果可以看出, miR164b 对靶基因

Cla018596 的表达表现为负调控, 而对其他 3 个靶基因的表达没有明显的相关性。说明 miR164b 对靶基因的调控比较复杂, 仍需进一步的研究。

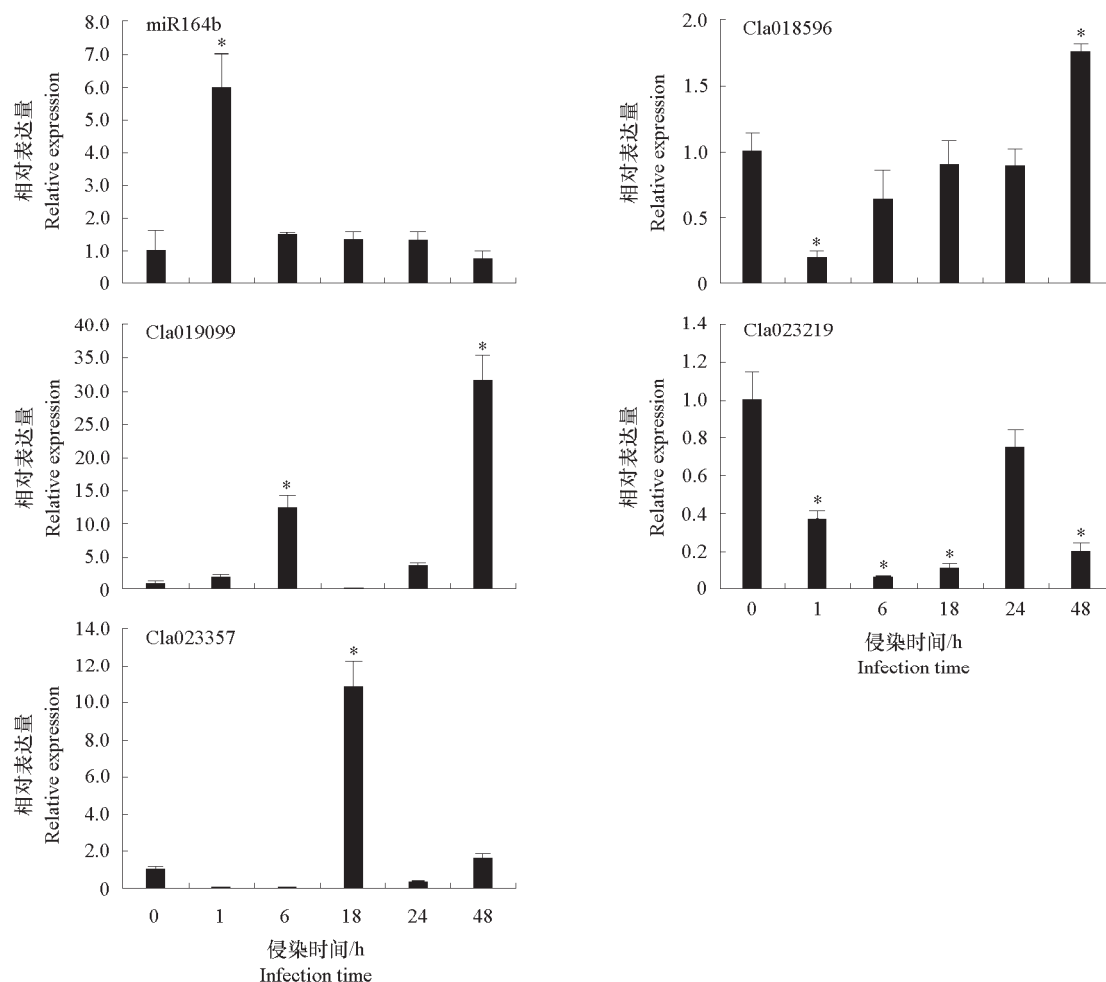


图 6 miR164b 和靶基因在黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 不同侵染阶段的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of miR164b and target gene post CGMMV infection

* $P < 0.05$.

3 讨论

目前,越来越多的参与植物病毒胁迫应答的 miRNA 被挖掘出来。例如,对大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV) 侵染前后的叶片进行 miRNA 组测序, 获得参与对 SMV 胁迫应答的 miRNA, 对其靶基因进行 5'-RACE 分析, 证实 miR160、miR393 和 miR1510 参与对 SMV 的胁迫响应 (Yin et al., 2013)。通过对接种黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 前后的番茄植株进行 miRNA 组测序, 共有 79 个已知和 40 个新颖 miRNA 呈现差异表达, 这些 miRNA 主要调控胁迫应答及光合作用相关基因的表达 (Feng et al., 2014)。本课题组前期通过对 CGMMV 侵染前后的西瓜叶片进行 miRNA 高通量测序, 获得一些参与 CGMMV 胁迫应答的 miRNA, 如 miR164b (Sun et al., 2017)。对 miR164b 进行相关生物学分析和试验验证可为揭示 miR164b 对 CGMMV 应答的分子机制奠定基

础。

本研究对鉴定到的 miR164b 前体基因 Pre-miR164b 进行克隆及序列分析。结果显示 Pre-miR164b 长度为 97 bp, 可形成稳定的二级发夹结构。Pre-miR164b 序列与大豆 gma-MIR164g (MI0021685) 相似性最高。与拟南芥 Pre-miR164a 启动区所含顺式作用元件类似 (Bazzini et al., 2009), 西瓜 Pre-miR164b 启动子区同样含有 Box-W1 和 TCA-element 等顺式调控元件。

拟南芥中, *CUC1* 和 *CUC2* 受 miR164 转录后调控 (Gustafson et al., 2005; Raman et al., 2008)。降解组测序对西瓜 miR164b 的靶基因进行鉴定, 发现其靶向 4 个 NAC 转录因子基因。与大多数植物 miRNA 对靶基因的剪切作用类似, miR164b 对靶基因 *NAC* 的切割发生在 miRNA 配对碱基的第 10 位。大多数 miRNA 与靶基因之间的表达模式为负相关。在拟南芥中, miR398 与靶基因 *CSD* 在不同组织和发育阶段的表达模式表现为负相关 (Sunkar et al., 2006); 玉米 (*Zea mays*) miR166 和靶基因 *leaf1* 之间存在负调控表达 (Juarez et al., 2004), 而拟南芥的成熟 miR393 与靶基因 *AFB1* 的表达模式不存在典型的负相关 (Chen et al., 2011)。本研究中, miR164b 与靶基因 Cla018596 的表达模式表现为负调控, 而与靶基因 Cla019099、Cla023219、Cla023357 的表达模式不存在相关性, 说明 miR164b 对靶基因的调控机制比较复杂。

植物 NAC 基因调控植物激素信号转导相关基因表达。在拟南芥中, *NAC1* 过表达植株中生长素响应基因 *AIR3*、*DBP* 的表达上调, 而在反义植株中表达量下调 (Hegedus et al., 2003); 棉花 *GhATAF1* 过表达诱导 ABA 胁迫响应基因 *GhABAI4*、离子通道基因 *GhHKT1*、胁迫响应基因 *GhAVP1*、*GhRD22*、*GhDREB2A*、*GhLEA3* 和 *GhLEA6* 的表达; 此外, *GhATAF1* 过表达抑制 JA 相关信号转导, 刺激 SA 相关信号转导 (He et al., 2016)。进一步研究西瓜 NAC 转录因子调控植物激素的信号转导对于揭示 miR164b 及靶基因参与 CGMMV 胁迫应答的分子机理及调控网络至关重要。

References

- Baker C C, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz E M. 2005. The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15: 303 - 315.
- Bazzini A A, Almasia N I, Manacorda C A, Mongelli V C, Conti G, Maroniche G A, Rodriguez M C, Distéfano A J, Hopp H E, del Vas M, Asurmendi S. 2009. Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biology*, 9: 152.
- Bazzini A A, Hopp H E, Beachy R N, Asurmendi S. 2007. Infection and co-accumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 12157 - 12162.
- Chen Z H, Bao M L, Sun Y Z, Yang Y J, Xu X H, Wang J H, Han N, Bian H W, Zhu M Y. 2011. Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 77: 619-629.
- Collinge M, Boller T. 2001. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology*, 46 (5): 521 - 529.
- Feng J, Liu S, Wang M, Lang Q, Jin C. 2014. Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with *Cucumber mosaic virus* based on deep sequencing. *Planta*, 240 (6): 1335 - 1352.
- Guo H S, Xie Q, Fei J F. 2005. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor *NAC1* to down regulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant Cell*, 17: 1376 - 1386.
- Gustafson A M, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington J C, Kasschau K D. 2005. ASRP: the *Arabidopsis* small RNA project database. *Nucleic Acids Research*, 33: 637 - 640.
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S, Lydiat D. 2003. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 53: 383 - 397.
- He X, Zhu L, Xu L, Guo W, Zhang X. 2016. *GhATAF1*, a NAC transcription factor, confers abiotic and biotic stress response by regulating

- phytohormonal signaling network. *Plant Cell Reports*, 35: 2167 – 2179.
- Juarez M T, Kui J S, Thomas J, Heller B A, Timmermans M C P. 2004. microRNA-mediated repression of rolled leaf specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428: 84 – 88.
- Kasschau K D, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman E J, Krian K A, Carrington J C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4: 205 – 217.
- Kehr J, Buhtz A. 2007. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany*, 59: 85 – 92.
- Khraiwesh B, Zhu J K, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 137 – 148.
- Kim J H, Woo H R, Kim J, Lim P O, Lee I C, Choi S H, Hwang D, Nam H G. 2009. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science*, 323: 1053 – 1057.
- Larue C T, Wen J, Walker J C. 2009. A microRNA-transcription factor module regulates lateral organ size and patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58: 450 – 463.
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J. 2004. MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development*, 131: 4311 – 4322.
- Lescot M, Déhais P, Moreau Y, De Moor B, Rouzé P, Rombauts S. 2002. PlantCARE: a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 325 – 327.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Llave C. 2004. MicroRNAs: more than a role in plant development? *Molecular in Plant Pathology*, 5: 361 – 366.
- Mallory A C, Dugas D V, Bartel D P, Bartel B. 2004. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology*, 14: 1035 – 1046.
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. 2006. The balance between the miR164A and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 2929 – 2945.
- Phookaew P, Netrphan S, Sojikul P, Narangajavana J. 2014. Involvement of miR164- and miR167-mediated target gene expression in responses to water deficit in cassava. *Biologia Plantarum*, 58 (3): 469 – 478.
- Raman S, Greb T, Peaucelle A, Blein T, Laufs P, Theres K. 2008. Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55: 65 – 76.
- Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16: 1616 – 1626.
- Rogers K, Chen X. 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25: 2383 – 2399.
- Shi R, Chiang V L. 2005. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, 39: 519 – 525.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18: 2051 – 2065.
- Sun Y, Niu X, Fan M. 2017. Genome-wide identification of *Cucumber green mottle mosaic virus*-responsive microRNAs in watermelon. *Archives of Virology*, 162: 2591 – 2602.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N H. 2000. *Arabidopsis NAC1* transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development*, 14: 3024 – 3036.
- Xie Q, Sanz-Burgos A P, Guo H, García J A, Gutiérrez C. 1999. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, 39 (4): 647 – 656.
- Yin X, Wang J, Cheng H, Wang X, Yu D. 2013. Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to *Soybean mosaic virus*. *Planta*, 237 (5): 1213 – 1225.
- Zhu G, Chen G, Zhu J, Zhu Y, Lu X, Li X, Hu Y, Yan Y. 2015. Molecular characterization and expression profiling of *NAC* transcription factors in *Brachypodium distachyon* L. *PLoS ONE*, 10 (10): e0139794.