doi: 10.11707/j.1001-7488.20150608

# 毛竹 miR397 和 miR1432 的克隆及其逆境胁迫响应表达分析*

王丽丽 赵韩生 孙化雨 董丽莉 娄永峰 高志民
(国际竹藤中心 竹藤科学与技术重点开放实验室 北京 100102)

**摘 要**: 【目的】miRNA 作为一种非编码基因在植物生长发育以及抗逆等过程中起着重要的调控作用。通过分析毛竹 miR397 和 miR1432 前体序列的结构特点,研究其组织表达特异性,分析其经光照、温度、干旱、NaCl 等非生物胁迫以及激素处理后的表达变化,以期为进一步揭示其功能以及未来竹子抗逆育种的分子设计提供参考。【方法】通过茎环引物法和 RT-PCR 技术,以毛竹为材料分离 miR397 和 miR1432 的前体序列,利用在线平台 Web LOGO 分析 miRNA 成熟序列的碱基保守性,用 MEGA 6.0 软件构建基于 miRNA 前体的系统进化树。借助在线平台 RNAfold WebServer 预测二者前体二级结构。直接从 BambooGDB 下载 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 前体上游的 1 500 bp 序列,利用在线平台 Plant CARE 分析其所含作用元件。采用实时定量 PCR 方法分析 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 在毛竹根、茎、叶和鞘中的表达情况,以及检测经黑暗、强光(1 500 μmol·m$^{-2}$s$^{-1}$)、高温(42 ℃)、低温(4 ℃)、NaCl(250 mmol·L$^{-1}$)、$GA_3$ 溶液(100 μmol·L$^{-1}$)、ABA 溶液(100 μmol·L$^{-1}$)处理 2 h 后毛竹叶片中 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达变化。【结果】从毛竹中分别克隆出 miR397 和 miR1432 的前体序列,均为 88 bp,且分别包含其成熟序列,均为 21 bp。前体序列均能形成稳定的茎环结构,且成熟序列均产生于前体茎环结构 5′端臂上。miR1432 家族成熟序列的碱基保守性整体高于 miR397 家族。毛竹二者前体上游调控区均含有启动子基本作用元件,如 TATA-box,CAAT-box; 同时存在很多逆境(光、干旱、温度等)胁迫相关响应元件以及激素响应元件等,意味着 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 可能受到逆境胁迫和激素的调节。*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 均在叶鞘中表达丰度最高,最低丰度 *phe*-miR397 出现在幼茎中,而 *phe*-miR1432 则在叶片中。经强光、黑暗、高温、低温、NaCl 等胁迫处理后,叶片中 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达均下调; 干旱和 ABA 处理后,*phe*-miR397 的表达下调,而 *phe*-miR1432 则上调; $GA_3$ 处理后,*phe*-miR397 的表达上调,*phe*-miR1432 则下调。【结论】*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 作为毛竹中 2 个保守型 miRNA,在受光照、温度、干旱和 NaCl 的胁迫以及 ABA 和 $GA_3$ 的处理时,其表达均呈现了不同程度的下调或上调,这暗示着它们可能在毛竹应对非生物胁迫的抗逆过程中起重要的调控作用,且与内源激素的调节相关联。

**关键词**: 毛竹; miRNA; 非生物胁迫; 激素
**中图分类号**: S718.46 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-7488(2015)06-0063-08

## Cloning and Expression Analysis of miR397 and miR1432 in *Phyllostachys edulis* under Stresses

Wang Lili Zhao Hansheng Sun Huayu Dong Lili Lou Yongfeng Gao Zhimin
(*Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, International Center for Bamboo and Rattan Beijing* 100102)

**Abstract**: 【Objective】Stress is one of the main factors affecting growth, development and formation of biological production and quality of plant. As non-coding genes, miRNAs play important roles in regulating plant growth and the processes of stress resistance. To reveal the function of miR397 and miR1432 in bamboo and provide a basis for molecular design of bamboo resilience breeding in future, the structural features of miR397 and miR1432 precursor sequences from *Phyllostachys edulis* were analyzed, the tissue-specific expression analysis as well as the expression changes of miR397 and miR1432 under abiotic stresses of drought, temperature, light, NaCl and hormone treatment were carried out. 【Method】

收稿日期:2014-08-04; ; 修回日期:2014-09-24。
基金项目:国家林业局 948 项目"小分子 RNA 分离技术引进"(2011-4-55); 国际竹藤中心基本科研业务费专项资金项目"毛竹快速生长期特异转录调控网络的构建及其应用"(1632015008)。

* 高志民为通讯作者。

The precursor sequences of miR397 and miR1432 of *P. edulis* were isolated using stem-loop primer method and RT-PCR technology, online platform Web LOGO was used for the conservation analysis of mature miRNA. MEGA 6.0 software was used for the construction of phylogenetic tree with miRNA precursor sequences. The secondary structure of the two precursors was predicted with the online platform RNAfold WebServer. The sequences of 1500 bp upstream of the precursor of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 were direct-downloaded respectively from BambooGDB and acting elements analysis was performed using online platform Plant CARE. Real-time quantitative PCR method was used for the tissue-specific expression analysis of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 in bamboo roots, stems, leaves and sheaths, and the expression changes in bamboo leaf after 2 h treatments of darkness, high light intensity (1 500 μmol·$m^{-2}s^{-1}$), high temperature (42 ℃), low temperature (4 ℃), NaCl (250 mmol·$L^{-1}$), $GA_3$ solution (100 μmol·$L^{-1}$) and ABA solution (100 μmol·$L^{-1}$) respectively.【Result】The isolated precursor sequences of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 were all 88 bp, containing 21 bp mature sequences correspondingly. The precursors of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 could fold into stable stem-loop structure, and the mature sequences were generated at 5′ end of the arm in the stem-loop structure respectively. Overall, the nucleotide conservative in mature sequence of miR1432 family was higher than that of miR397 family. Both are containing the essential elements of promoter, such as TATA-box and CAAT-box, in the regulatory region of the upstream precursors of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432. At the same time, many stress (light, drought, temperature, etc.) related response elements and hormone-responsive elements were found, indicating *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 may be regulated by stress and hormone. Both *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 expressed in leaf sheath with the highest level, while the lowest in young stem for *phe*-miR397 and in leaf for *phe*-miR1432. The expression of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 in leaf were all down-regulated after 2 h with the treatments of high light intensity, darkness, 42 ℃, 4 ℃ and NaCl. The expression of *phe*-miR397 was down-regulated under drought treatment as well as ABA, while that of *phe*-miR1432 was up-regulated. The expression of *phe*-miR397 was up-regulated and *phe*-miR1432 was down-regulated for $GA_3$ treatment.【Conclusion】As two conservative miRNAs in bamboo, the expression of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 were either up- or down-regulated under the stress treatments of light, temperature, drought and NaCl, as well as ABA and $GA_3$ treatments, indicating that they might play important regulatory roles in respond to abiotic stress resilience in bamboo, which were also associated with the regulation of endogenous hormones.

**Key words**: *Phyllostachys edulis*; miRNA; abiotic stress; hormones

MicroRNA(miRNA)是一类长度为 21 ~ 30 nt 的非编码小分子 RNA(de Lima *et al.*, 2012),miRNA 的转录和加工是在细胞核中进行的,而其最终发挥功能的场所在细胞质中。已知 miRNA 发挥作用的机制包括降解靶 mRNA(Kurihara *et al.*, 2004)、抑制靶 mRNA 的翻译(Qi *et al.*, 2005)以及对基因座位上的 DNA 进行甲基化修饰(Bao *et al.*, 2004),在植物中主要通过切割靶基因导致靶基因沉默的方式参与生长发育过程。研究表明,miRNA 在植物生长发育、细胞周期调控以及植物抗逆性等方面起着非常重要的作用(Lee *et al.*, 2001),其中许多 miRNA 参与了植物非生物逆境的应答调节,如在低温(4 ℃)、高温(38 ℃)胁迫条件下,旱芹(*Apium graveolens*)中 miR160,miR164,miR394,miR395 和 miR408 的表达均上调(Li *et al.*, 2014);在高温(42 ℃)、NaCl(250 mmol·$L^{-1}$)、干旱(20% PEG 和 300 mmol·$L^{-1}$甘露醇)等胁迫条件下,芥菜(*Brassica juncea*)miR395_2 的表达上调,miR390_1 和 miR172_2 的表达均下调(Bhardwaj *et al.*, 2014);葡萄(*Vitis vinifera*)的 *Vvi*-miR159b, *Vvi*-miR160f, *Vvi*-miR171e, *Vvi*-miR171f, *Vvi*-miR171h, *Vvi*-miR393a 和 *Vvi*-miR393b 受外施 $GA_3$ 的诱导表达(Han *et al.*, 2014a);在 ABA 和盐胁迫条件下,欧洲山杨(*Populus tremula*)miR398 呈现动态调节,在 3 ~ 4 h 内其表达受到诱导,在 48 h 后开始下降,至 72 h 又开始积累,而盐胁迫条件下拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 miR398 的表达稳定,并且在 ABA 胁迫条件下呈现与欧洲山杨中相反的情况(Jia *et al.*, 2009)。随着全球环境的变化,干旱、高温、低温、盐碱等非生物胁迫已经成为影响植物正常生长的关键因素,开展植物抗逆研究对于培育植物抗逆新品种具有重要的价值。

竹子是重要的森林植物资源,在应对全球环境的恶化、森林资源匮乏、能源危机等方面发挥着重要作用。竹子在长期的进化过程中形成了对各种非生物胁迫的保护与适应机制,具有较强的可塑性。对竹子抗逆生理的研究主要集中于活性氧代谢、膜脂过氧化、抗氧化酶系统、渗透调节系统和光合生理等方面(刘玉芳等, 2014),随着认识的不断深入,单纯

从生理角度来认知竹子的抗逆机制存在着局限性，人们开始从分子水平来进行相关研究。目前已分离了甘油醛－3－磷酸脱氢酶基因（杨洋等，2010）、液泡膜 $Na^+/H^+$ 逆向运输蛋白基因（张智俊等，2011）、*BoBZF*（高志民等，2012）、*PheWRKY1*（Cui *et al.*，2013）等许多抗逆相关基因，但多仅限于基因的克隆分析或功能的初步研究。关于竹类植物 miRNA 的研究也日趋受到重视，通过高通量测序技术与生物信息学技术相结合的方法，从麻竹（*Dendrocalamus latiflorus*）叶片中获得了 84 个保守的 miRNA 和 81 个新 miRNA，并对其中 30 个新 miRNA 研究证明它们的表达受光照的诱导或抑制（Zhao *et al.*，2013）。对毛竹（*Phyllostachys edulis*）和麻竹叶片中的 miRNA 比较分析并通过试验验证表明，miR397，miR1432 和 miR7748 只存在于毛竹叶片中（Zhao *et al.*，2014）。为研究 miRNA 在竹子非生物胁迫中的表达调控作用，本研究以毛竹为对象，分离 miR397 和 miR1432 的成熟序列、前体序列，在对前体上游启动子序列所包含的逆境应答元件分析的基础上，研究了温度、光照、干旱、激素等非生物胁迫对毛竹叶片中 miR397 和 miR1432 表达的影响，以期为进一步研究其功能以及未来竹子抗逆品种的分子设计提供参考。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

毛竹半年生实生苗，盆栽于本实验室的培养室内，栽培基质为腐殖质土和蛭石（7∶3），培养温度为 25 ℃，光照 200 $\mu mol \cdot m^{-2}s^{-1}$，光/暗为16 h/8 h。

### 1.2　基因组 DNA 提取、总 RNA 提取与 cDNA 合成

分别取毛竹的根、幼茎、顶端第 3 片叶的叶片及叶鞘以及不同处理后的毛竹叶片（顶端第 3 片叶），迅速放入液氮中研磨成粉末状，采用改良的 CTAB 法（高志民等，2006）提取基因组 DNA，Trizol 法（Gao *et al.*，2006）提取总 RNA。按照反转录试剂盒说明书（Promega 公司）合成 cDNA。

### 1.3　miRNA 克隆与测序

分别根据毛竹 miR397 及 miR1432 成熟序列及前体序列（PH01000093/PH01011011）（http：//www.bamboogdb.org/）设计反转录颈环引物（Chen *et al.*，2005）、正向引物（forward primer）和反向通用引物（universal reverse primer），其中茎环部分通用序列为：5′-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG-3′（表 1），由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为：10 × PCR Buffer 2 μL，dNTP（2.5 mmol·$L^{-1}$）2 μL，正向引物（10 μmol·$L^{-1}$）1 μL，反向引物（10 μmol·$L^{-1}$）1 μL，DMSO 1 μL，cDNA 0.5 μL，高保真酶（Pyrobest）0.1 μL（5 U·$\mu L^{-1}$），加水补足至20 μL。反应条件：94 ℃ 30 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 35 个循环。

回收 PCR 产物，进行加 A 反应，反应体系10 μL：10 × PCR Buffer 1 μL，dATP（2.5 mmol·$L^{-1}$）1 μL，PCR 产物 7.9 μL，LA Taq 酶 0.1 μL。反应程序：72 ℃ 30 min。反应结束后连接到 pGEM-T easy 载体上，转化大肠杆菌（*Esherichia coli*）DH 5α 感受态细胞，阳性克隆经酶切检测分析后，送生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.4　生物信息学分析

利用公共数据库 miRBase 21（http：//www.mirbase.org/index.shtml）和 Bamboo GDB 下载水稻（*Oryza sativa*）、二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）、玉米（*Zea mays*）、大麦（*Hordeum vulgare*）、毛竹等禾本科植物的 miR397 和 miR1432 的成熟序列及前体序列，利用在线平台 WebLOGO（http：//weblogo.berkeley.edu/logo.cgi）分析 miRNA 成熟序列的碱基保守性，用 MEGA 6.0 软件构建基于 miRNA 前体的系统进化树。利用在线工具 RNAfold WebServer（http：//rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi）预测 miRNA 的前体二级结构。下载毛竹 miR397 和 miR1432 前体上游的 1 500 bp 序列，利用在线平台 Plant CARE 分析其所含作用元件（http：//bioinformatics.psb.ugent.be/Webtools/plantcare/html/）。

### 1.5　胁迫处理

选取长势一致的毛竹，分别进行处理。光照处理：将毛竹苗分别在黑暗处理 24 h、1 500 $\mu mol \cdot m^{-2}s^{-1}$ 光照处理 2 h；温度处理：42 ℃ 处理 2 h、4 ℃处理2 h；同时以实验室条件下生长的毛竹为对照。选取毛竹顶端第 3 片离体叶片，干旱处理：将叶片放入开口的空培养瓶中 2 h，同样以浸入蒸馏水中 2 h 的叶片为对照（王京京等，2012）；NaCl 处理：浸于 NaCl 溶液（250 mmol·$L^{-1}$）中 2 h，蒸馏水处理作为对照；激素处理：将叶片分别浸入 $GA_3$ 溶液（100 μmol·$L^{-1}$）、ABA 溶液（100 μmol·$L^{-1}$）中 2 h，分别以浸入甲醇、乙醇中 2 h 的叶片为对照（Kayal *et al.*，2006）。处理后分别取第 3 片叶片存－80 ℃备用。

### 1.6　实时荧光定量 RT-PCR

分别用毛竹根、茎、叶和鞘不同组织以及不同胁

迫处理后的样品 RNA 和颈环反转录引物合成 miRNA 特异性 cDNA，作为模板，进行 qRT-PCR，并用 U6 snRNA 为内参（Ding *et al*., 2011）。选用 Roche 公司的 LightCycle 480 SYBR Green I Master 试剂盒，PCR 反应体系为：Mix 5 μL，cDNA 0.4 μL，正向引物 0.2 μL，反向通用引物 0.2 μL，加水补足至 10 μL。反应程序为：95 ℃，10 min；95 ℃ 10 s；62 ℃10 s，共 50 个循环。反应在 Analytikjena 公司的 q-Tower 仪上进行，重复 3 次，反应结束后应用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 算法进行分析（Livak *et al*., 2001）。

**表 1 miRNAs 的 qRT-PCR 引物**

**Tab. 1 List of qRT-PCR primer sequences used for miRNAs**

| 名称 Name | 引物 Primer | 序列 Sequence（5′→3′） |
|---|---|---|
| miR397 | RT primer | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCATCAACG |
| | Forward primer | ACGGGCGATCATTGAGTGCAG |
| miR1432 | RT primer | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGTCGGTG |
| | Forward primer | ACGGGCGATTCAGGAGAGATG |
| Universal reverse primer | | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC |
| U6 | Forward primer | GGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAG |
| | Reverse primer | AATTTGGACCATTTCTCGATTTATGCGTGT |

## 2 结果与分析

### 2.1 miRNA 克隆与结构预测

分别用毛竹 miR397 和 miR1432 前体及成熟序列特异性引物进行 PCR 扩增，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示二者前体特异引物扩增产物均在 450 bp 左右有 1 条亮带，与预测的包含毛竹 miR397 和 miR1432 的前体序列的目的片段大小一致；成熟序列特异引物扩增产物均在 70 bp 左右有 1 条亮带，与预测的 miR397 及 miR1432 茎环法反转录扩增序列大小一致。测序结果表明，前体序列特异性引物扩增产物分别为 443 bp 和 439 bp，分别包含 miR397 和 miR1432 前体序列，均为 88 bp；成熟序列特异性茎环引物扩增产物分别为 65 bp 和 66 bp，且分别包含其成熟 miRNA 序列，均为 21 bp。

通过对前体序列二级结构的预测发现，毛竹 miR397 和 miR1432 的前体序列均能形成稳定的茎环结构，且成熟序列均产生于前体茎环结构 5′端臂上（图 1），它们与其他单子叶植物 miR397 和 miR1432 的前体有着类似的结构，其前体分别命名为 *phe-MIR397* 和 *phe-MIR1432*，成熟 miRNA 分别命名为 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432。

### 2.2 miRNA 序列分析

对单子叶植物 miR397 和 miR1432 成熟序列碱基保守性分析结果表明，2 个 miRNA 家族均具有较高的保守性，但 miR1432 家族的碱基保守性整体高于 miR397 家族。miR397 家族主要在第 6，8，10，11，12，13，19 及 21 位上的碱基保守性较强些，*phe*-miR397 的成熟序列（5′-UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG-3′）与其他单子叶植物 miR397 家族成员大部分序列保持一致（图 2）；而来自单子叶植物的 miR1432 家族成员只有 6 个，其碱基保守性整体较高，尤其在第 3，4，5，6，7，11，15 和 19 位的碱基在不同家族成员间都是相同的，而 *phe*-miR1432 的成熟序列（5′-UUCAGGAAGUAGCUCGUAGGA-3′）也在第 4，5，6，7，11，15 和 19 位表现出较高的碱基保守性（图 1）。由此表明，miR397 和 miR1432 两个家族成员在单子叶植物的进化过程中是比较保守的。

构建基于前体序列系统进化树的结果表明，来自单子叶植物和双子叶植物的 *MIR397* 家族不同成员大多数分别聚类到 2 个大的分支，与植物进化的保守性相一致，当然也有例外，如来自葡萄的 *vvi-MIR397a* 和欧丹参（*Salvia sclarea*）的 *ssl-MIR397* 聚类到双子叶植物大分支之外的一个小分支，更有来自双子叶植物毛果杨（*Populus trichocarpa*）的 *ptc-MIR397c* 和单子叶植物玉米的 *zma-MIR397a* 聚类在另一个与 2 大分支较远的一个小分支（图 3A）；另外，来自单子叶植物同一物种的 *MIR397* 家族不同成员被聚类到不同的分支，表明植物 miRNA 前体序列具有比较丰富的多样性。

目前在 miRBase 21 中的 miR1432 的前体序列仅有 6 条，且差异较大，聚类分支比较分散，毛竹的 *phe-MIR1432* 虽与水稻的 *osa-MIR1432* 聚类到相对较近的分支，但总体而言进化关系较远（图 3B）。

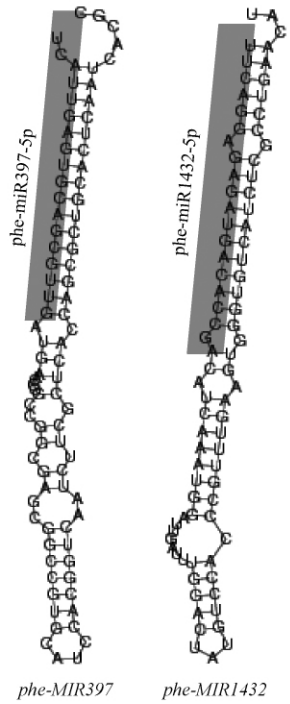


图 1　前体二级结构预测

Fig. 1　Secondary structure prediction of precursor

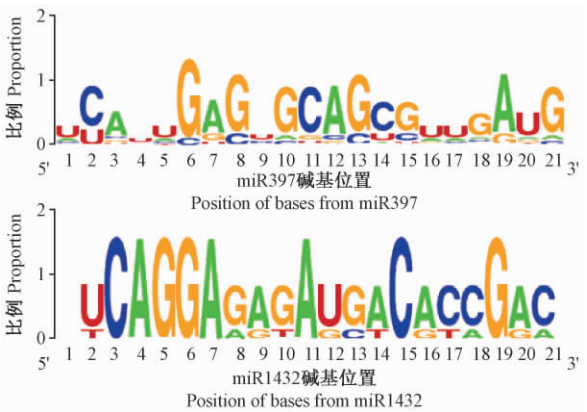


图 2　miR397 和 miR1432 成熟序列碱基保守性分析

Fig. 2　Conserved nucleotide sequence analysis of miR397 and miR1432

对毛竹 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 前体上游调控区作用元件分析结果表明，二者均含有启动子基本作用元件，如 TATA-box，CAAT-box；同时存在很多逆境（光、干旱、温度等）胁迫相关响应元件，另外还包括一些其他调节元件，如激素响应元件等（表 2）。这意味着 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 可能受到一些逆境胁迫的调节，其表达将会因逆境胁迫而上调或者下调。

### 2.3　miRNA 组织特异性表达分析

实时定量 PCR 结果表明：*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 在毛竹根、茎、叶和鞘中都有表达，但是表达丰度存在一定的差异，在茎、叶和鞘中 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达量与根中的相比，差异均达到极显著水平（$P < 0.01$）；虽然 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 均在叶鞘中表达丰度最高，但表达丰度最低的部位，*phe*-miR397 出现在幼茎中，*phe*-miR1432 则出现在叶片中（图 4）。

### 2.4　胁迫条件下 miRNA 的表达分析

与对照相比，经过强光（1 500 μmol·m$^{-2}$s$^{-1}$）和黑暗处理后 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的相对表达量均呈现一定程度的下调，差异均达到极显著水平（$P < 0.01$），其中黑暗处理比强光处理对 *phe*-miR397 的表达影响更大，处理后其表达量约为对照的 57%；而黑暗和强光处理对 *phe*-miR1432 表达的抑制均比较明显，尤其是强光条件下其表达量仅为对照的 30%（图 5A）。

经高温（42 ℃）和低温（4 ℃）处理后，*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达均不同程度的下调，差异均达到极显著水平（$P < 0.01$），其中高温处理后 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 表达量下降程度较低，分别为对照的 70% 和 58%；而低温处理后二者的表达均受到较大程度的抑制，*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达量分别为对照的 8% 和 13%（图 5B）。

在干旱处理后 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达呈现相反的情况，*phe*-miR397 的表达下调为对照的 89%，而 *phe*-miR1432 的表达却上调为对照的 1.89 倍，差异均达到极显著水平（$P < 0.01$）；NaCl 处理后 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达均呈现一定程度的下调，差异也均达到极显著水平（$P < 0.01$），其中 *phe*-miR1432 的表达下调更为明显，仅为对照的 61%（图 5C）。

$GA_3$ 和 ABA 处理后，与对照相比，*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达均呈现相反的情况，其中 *phe*-miR397 在 $GA_3$ 处理后明显上调（约为对照的 1.7 倍），*phe*-miR1432 明显下调（约为对照的 56%），差异均达到极显著水平（$P < 0.01$）（图 6 A）；ABA 处理后 *phe*-miR397 下调，差异达到极显著水平（$P < 0.01$），*phe*-miR1432 上调，但差异不显著（图 6B）。

## 3　讨论

环境的日益变化使得人们对非生物逆境条件下植物自身调节机制的研究越来越重视，这是培育抗逆新品种的前提条件之一。研究表明，在植物感受逆境胁迫而做出适应性调整过程中 miRNA 通过调控靶基因的表达来参与植物逆境的调控（Sunkar *et al.*, 2004; Khraiwesh *et al.*, 2012），且许多 miRNA 的

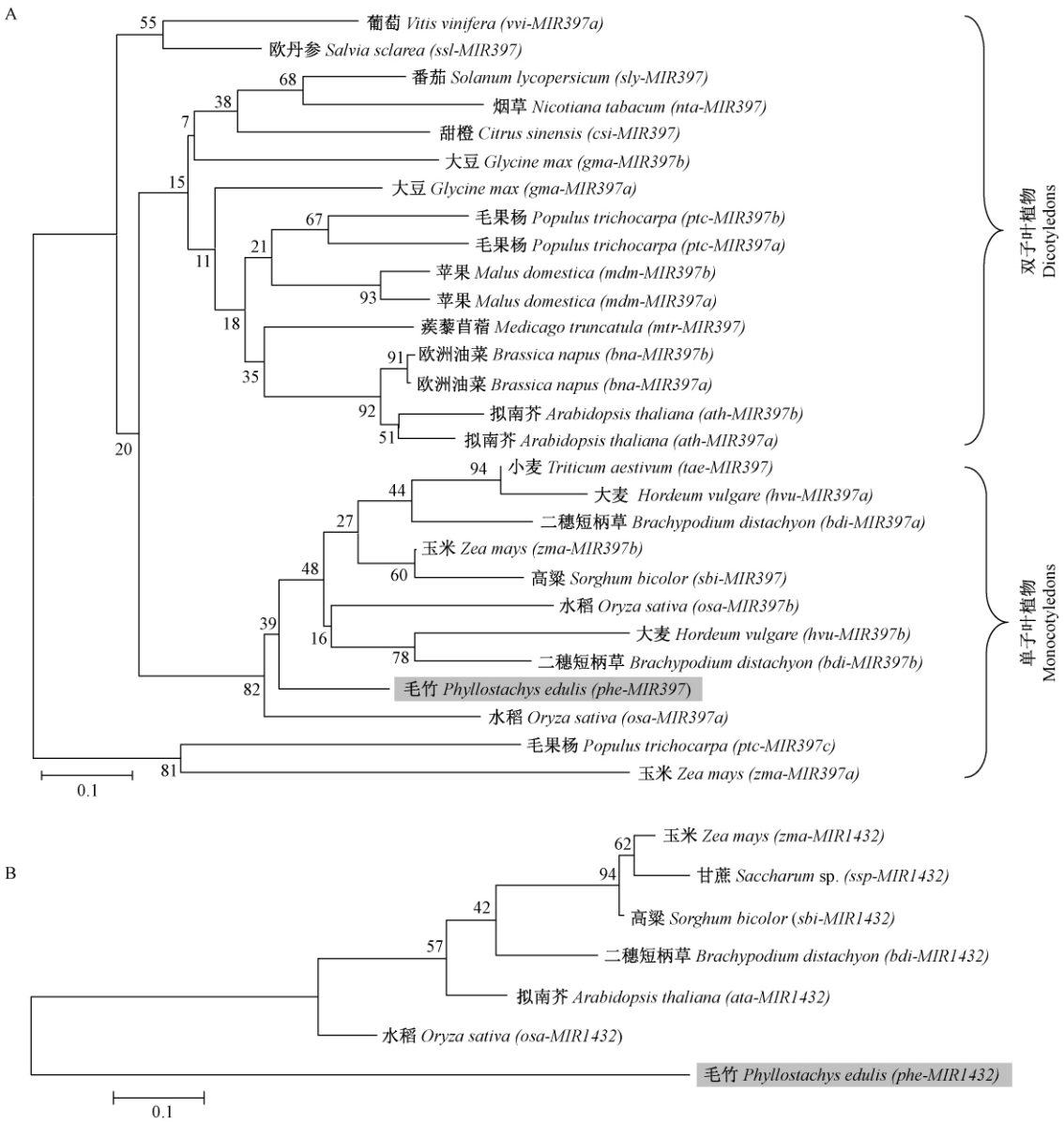


图 3 基于前体序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the sequence of precursors

A: *MIR397* 系统进化树; B: *MIR1432* 系统进化树

A: Phylogenetic tree of *MIR397*; B: Phylogenetic tree of *MIR1432*

**表 2 MiRNA 前体上游启动子区域顺式调控元件**

**Tab. 2 *Cis*-elements in promoter region of miRNA**

| miRNA 名称<br>miRNA name | 启动子包含的应答元件<br>Responsive elements in promoter region | 应答环境因子<br>Responsive environmental factors |
|---|---|---|
| *phe*-miR397 | ACE, G-Box, G-box, GA-motif, GAG-motif, CATT-motif, I-box, TCT-motif | 光 Light |
| | HSE | 温度 Temperature |
| | ABRE | 激素 Hormones |
| | MBS | 干旱 Drought |
| | ARE | 厌氧诱导 Anaerobic induction |
| *phe*-miR1432 | Box4, Box I, G-box, GT1-motif, SpI, TCT-motif, chs-CMA2a | 光 Light |
| | HSE, LTR | 温度 Temperature |
| | GARE-motif, TGA-motif | 激素 Hormones |
| | MBS | 干旱 Drought |
| | ARE | 厌氧诱导 Anaerobic induction |

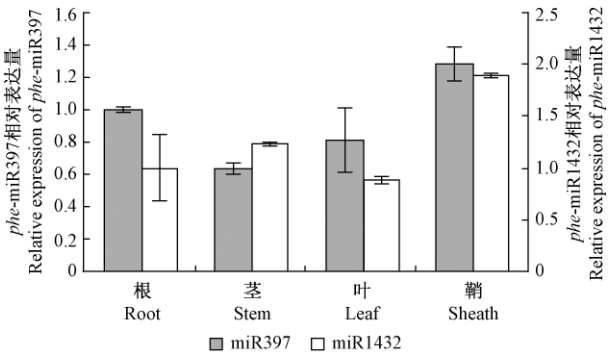


图 4　*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 在不同组织中的表达分析

Fig. 4　Expression analysis of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 in different tissues

表达都具有组织特异性（Meng *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014b）。本研究对 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达分析发现，二者在根、茎、叶和鞘中均有表达，这可能与其参与多种非生物胁迫调控有关。miRNA 本身的表达受到自身启动子以及相关转录因子的调控，植物可以通过启动子中顺式作用元件与转录因子的相互协调作用，对光、温度、水分等非生物逆境产生响应，来调控基因的表达。本研究通过对毛竹 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 启动子结构分析显示，它们都含有许多逆境胁迫相关响应元件，这意味着它们参与多种逆境胁迫的调控，这在对 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达检测中得到了证实，二者的表达均受到 NaCl、高温、低温、强光和黑暗等胁迫条

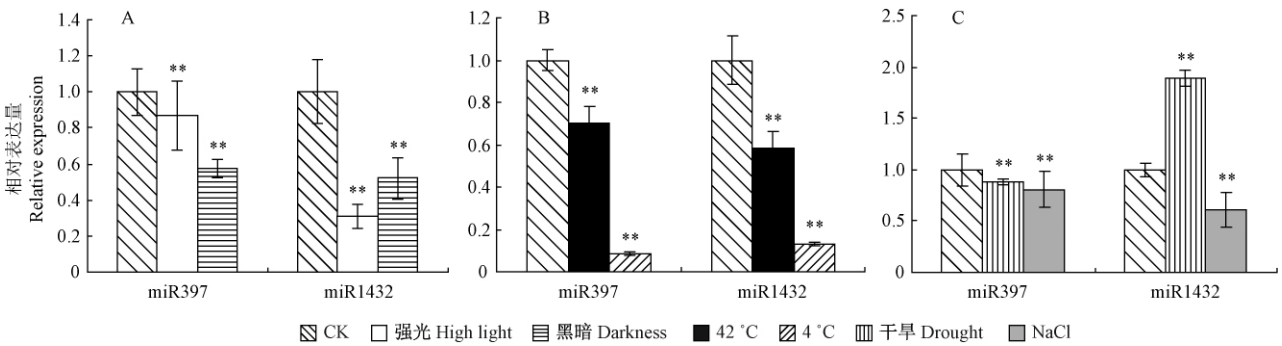


图 5　不同非生物胁迫处理毛竹叶片中 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 表达分析

Fig. 5　Expression analysis of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 in leaf of *P. edulis* under different abiotic stresses

A：光照处理；B：温度处理；C：干旱、NaCl 处理。** 表示极显著水平（$P < 0.01$），下同。A: Treated with light; B: Treated with temperature; C: Treated with drought and NaCl. ** indicates a significant level ($P < 0.01$), the same below.

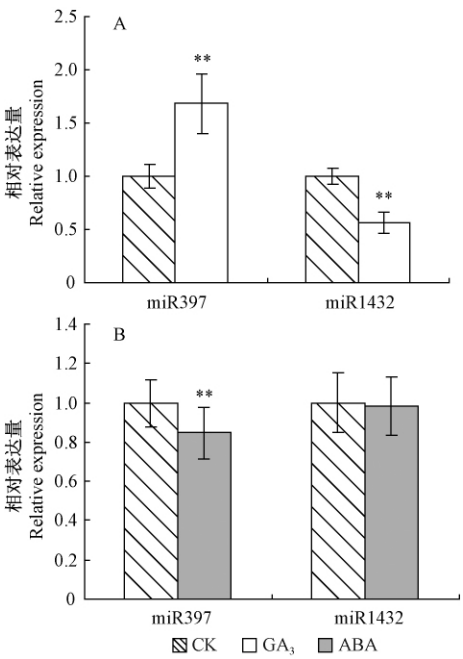


图 6　$GA_3$ 和 ABA 处理毛竹叶片中 *phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *phe*-miR397 and *phe*-miR1432 in leaf of *P. edulis* treated with $GA_3$ or ABA

A：$GA_3$ 处理；B：ABA 处理。A: Treated with $GA_3$; B: Treated with ABA.

件的抑制。在干旱条件下，*phe*-miR397 表达受抑制，而 *phe*-miR1432 表达则被诱导；经 $GA_3$ 和 ABA 处理后，*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 的表达呈现相反的表达趋势。

miRNA 的表达与调控是一个极为复杂的网络系统，存在 1 个 miRNA 能够调控多个靶基因的情况，决定了其所参与生物过程的广泛性；同时也存在多个 miRNA 共同调控 1 个靶基因的情况，体现了其精细调控，为植物细胞应对复杂的非生物胁迫环境变化做出精确的反应，在植物体内形成了 miRNA－转录因子－靶基因前反馈环路网络（Meng *et al.*, 2012）。在逆境胁迫条件下，植物 miRNA 处于较为复杂的调控网络之中，包括其他相关 miRNA、激素、靶基因等多方面因素（Ding *et al.*, 2013）。*phe*-miR397 和 *phe*-miR1432 作为 2 个保守型的 miRNA，在受光照、温度、干旱、NaCl、激素等胁迫时，其表达均呈现了不同程度的变化，或下调或上调，说明二者可能参与了毛竹逆境胁迫的应答反应与调控。另外，研究表明过量表达 miR397 的拟南芥植株抗盐性有明显的提高（Liu *et al.*, 2008），miR397b 通过对木质素生物合成中漆酶的调控来实现对拟南芥的木质素含量以及种子数量的调控

(*Wang et al.*, 2014),说明具有多种功能,而在竹子中 miRNAs 是如何实现对靶基因精准调控的尚需进一步研究。因此,将多个 miRNA 及其靶基因相结合起来,对逆境胁迫条件下的竹类植物进行研究,揭示其网络调控机制,并进行分子设计,可能是未来竹类植物抗逆分子育种的有效途径。

## 参 考 文 献


高志民,范少辉,高 健,等. 2006. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨. 林业科学研究,19(6):725 - 728.

(Gao Z M, Fan S H, Gao J, *et al*. 2006. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method. Forest Research, 19(6): 725 - 728. [in Chinese])

高志民,刘 青,牟少华,等. 2012. 绿竹锌指蛋白基因 *BoBZF* 的克隆及功能初步分析. 林业科学,48(10):49 - 54.

(Gao Z M, Liu Q, Mu S H, *et al*. 2012. Cloning and primary functional analysis of a zinc finger protein gene of *BoBZF* from *Bambusa oldhamii*. Scientia Silvae Sinicae, 48(10): 49 - 54. [in Chinese])

刘玉芳,陈双林,李迎春,等. 2014. 竹子生理可塑性的环境胁迫效应研究进展. 浙江农林大学学报,31(3):473 - 480.

(Liu Y F, Chen S L, Li Y C, *et al*. 2014. Environmental stress on physiological plasticity of bamboo: a review. Journal of Zhejiang A & F University, 31(3): 473 - 480. [in Chinese])

王京京,童再康,黄程前,等. 2012. 巨桉 *EgrCBF1* 和 *EgrCBF2* 基因的克隆和胁迫响应表达分析. 林业科学,48(10):42 - 48.

(Wang J J, Tong Z K, Huang C Q, *et al*. 2012. Cloning of *EgrCBF1* and *EgrCBF2* genes from *Eucalyptus grandis* and their expression under stresses. Scientia Silvae Sinicae, 48(10): 42 - 48. [in Chinese])

杨 洋,张智俊,罗淑萍. 2010. 毛竹甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶基因的克隆与序列分析. 经济林研究,28(3):7 - 13,24.

(Yang Y, Zhang Z J, Luo S P. 2010. Cloning and sequence analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in *Phyllostachys edulis*. Nonwood Forest Research, 28(3): 7 - 13, 24. [in Chinese])

张智俊,杨 洋,罗淑萍,等. 2011. 毛竹液泡膜 $Na^+/H^+$ 逆向运输蛋白基因克隆及表达分析. 农业生物技术学报,19(1):69 - 76.

(Zhang Z J, Yang Y, Luo S P, *et al*. 2011. Molecular cloning and expression analysis of a vacuolar $Na^+/H^+$ antiporter gene in moso bamboo. Journal of Agricultural Biotechnology, 19(1): 69 - 76. [in Chinese])

Bao N, Lye K W, Barton M K. 2004. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class Ⅲ HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. Dev Cell, 7(5): 653 - 662.

Bhardwaj A R, Joshi G, Pandey R, *et al*. 2014. A Genome-Wide Perspective of miRNAome in response to high temperature, salinity and drought stresses in *Brassica juncea* (Czern) L. PLoS ONE, 9(3): e92456.

de Lima J C, Loss-Morais G, Margis R. 2012. MicroRNAs play citical roles during plant development and in response to abiotic stresses. Genetics and Molecular Biology, 35(4): 1069 - 1077.

Chen C, Ridzon D A, Gurgler K J, *et al*. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res, 33(20): e179.

Cui X W, Ying Z, Qi F Y, *et al*. 2013. Overexpression of a moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) transcription factor gene *PheWRKY1* enhances disease resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Botany, 91: 486 - 494.

Ding Y F, Tao Y L, Zhu C. 2013. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. J Exp Bot, 64(11): 3077 - 3086.

Ding Y, Chen Z, Zhu C. 2011. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). J Exp Bot, 62(10): 3563 - 3573.

Gao Z M, Li X P, Li L B, *et al*. 2006. An effective method for total RNA isolation from bamboo. Chinese For Sci Tech, 5(3): 52 - 54.

Han J, Fang J, Wang C, *et al*. 2014a. Grape vine microRNAs responsive to exogenous gibberellin. BMC Genomics, 15: 111.

Han R, Jian C, Lv J, *et al*. 2014b. Identification and characterization of microRNAs in the flag leaf and developing seed of wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Genomics, 15: 289.

Jia X, Wang W X, Ren L, *et al*. 2009. Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 71(1/2): 51 - 59.

Kayal E W, Navarro M, Marque G, *et al*. 2006. Expression profile of *CBF-like* transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. J Exp Bot, 57(10): 2455 - 2496.

Khraiwesh B, Zhu J K, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochim Biophys Acta, 1819(2): 137 - 148.

Kurihara Y, Watanabe K. 2004. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer like 1 protein functions. Proc Natl Acad Sci USA, 101(34): 12753 - 12758.

Lee R C, Ambors V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorbabditis elegans*. Science, 294: 858 - 864.

Li M Y, Wang F, Xu Z S, *et al*. 2014. High throughput sequencing of two celery varieties small RNAs identifies microRNAs involved in temperature stress response. BMC Genomics, 15: 242.

Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle Ct}$ method. Methods, 25(4): 402 - 408.

Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al*. 2008. Microarray-based analysis of stress-getulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA, 14(5): 836 - 843.

Meng Y, Shao C, Ma X, *et al*. 2012. Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in *Arabidopsis*. PLoS ONE, 7(11): e50870.

Qi Y, Denli A M, Hannon G J. 2005. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. Mol Cell, 19(3): 421 - 428.

Sunkar R, Zhu J K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. Plant Cell, 16: 2001 - 2019.

Wang C Y, Zhang S, Yu Y, *et al*. 2014. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. Plant Biotechnol J, doi: 10.1111/pbi.12222.

Zhao H S, Chen D L, Peng Z H, *et al*. 2013. Identification and characterization of microRNAs in the leaf of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) by deep sequencing. PLoS ONE, 8(10): e78755.

Zhao H S, Wang L L, Dong L L, *et al*. 2014. Discovery and comparative profiling of microRNAs in representative monopodial bamboo (*Phyllostachys edulis*) and sympodial bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*). PLoS ONE, 9(7): e102375.


(责任编辑 徐 红)