

· 研究报告 ·

落叶松体胚发育中5个miRNA前体与成熟体的表达

张俊红^{1,2}, 张守攻¹, 吴涛¹, 韩素英³, 杨文华¹, 齐力旺^{1*}

¹中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091; ²浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300; ³中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091

摘要 利用同源比对或RACE克隆了5个落叶松(*Larix leptolepis*) miRNA前体。结果显示, 在各物种miRNA前体间, 成熟序列高度相似, 但其它序列相似度差异大, 序列相似度与亲缘关系有关。采用qRT-PCR分析了5个miRNA、前体和靶基因在落叶松体胚8个发育阶段的表达变化。结果显示, miRNA表达最高峰出现在后期子叶胚, 暗示与促进胚胎休眠有关; 表达次高峰出现时期不同, 表现为miR397和miR408在PEMIII, miR398在早期单胚, miR156和miR166在早期子叶胚, 表明其与保持薄细胞壁、质子传递、顶端分生组织形成等调控有关。miRNA成熟体表达与前体含量不呈线性相关, 可能受多重调控。研究结果对于阐明MIR基因进化、表达调控及在体胚发育中的调控功能具有重要理论意义。

关键词 表达分析, 落叶松, miRNA成熟体, miRNA前体, 体细胞胚胎发生

张俊红, 张守攻, 吴涛, 韩素英, 杨文华, 齐力旺 (2012). 落叶松体胚发育中5个miRNA前体与成熟体的表达. 植物学报 47, 462–473.

落叶松(*Larix ssp.*)是重要的针叶树种, 其体细胞胚胎发生途径不仅是重要的无性繁殖手段, 也为松杉类树种的胚胎发生机理研究提供了理想的实验体系。体细胞胚胎发生过程与合子胚发育高度相似(Pullman et al., 2003), 二者发生同步化使其能收集特定发育阶段的大量材料, 可作为研究植物胚胎发育的模式系统。体胚发生过程是个复杂的生物学事件, 涉及一系列信号转导过程和基因表达(Chugh and Khurana, 2002)。虽已分离出许多相关基因(Braybrook et al., 2006; Park and Harada, 2008), 但从体细胞诱导成胚性细胞、胚性的维持、再由胚性细胞发育成体细胞胚胎过程中的很多机制还不清楚, 仍不足以阐明胚胎发生机理和解决生产问题。研究表明, microRNA作为上层调控因子在胚胎发生过程中起重要调控作用(Carrington and Ambros, 2003; Fletcher et al., 2006)。

microRNA(miRNA)通过碱基互补原则切割靶基因mRNA、抑制翻译、介导DNA甲基化等实现调控功能(Bartel, 2004)。植物MIR基因经RNA聚合酶II转录产生初级miRNA前体(pri-miRNA)。DCL1切割产生miRNA前体(pre-miRNA), 再次切割形成miRNA:

miRNA*二聚体, HEN1甲基化修饰3'端碱基, HASTY转运二聚体出细胞核, miRNA成熟体进入AGO沉默复合体发挥调控作用(Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002)。miRNA的产生和作用过程中每个环节都受到调控。86%的MIR基因转录起始上游存在TATA box, 表明MIR基因受到转录水平上的调控(Xie et al., 2005)。滞留于转录点的pri-miRNA比多腺苷酸化的pri-miRNA被更有效地加工成pre-miRNAs(Pawlicki and Steitz, 2008)。RNA二级结构影响miRNA前体加工(Song et al., 2010)。miRNA前体的RNA编辑调控miRNA成熟体的产生和功能(Luciano et al., 2004)。此外, 成熟miRNA降解速率与靶基因丰度、互补性以及miRNA的3'端修饰有关(Chatterjee and Grosshans, 2009; Ameres et al., 2010; Arvey et al., 2010; Baccarini et al., 2011)。

miRNA是胚胎正常发生和顶端分生组织形成所必需的(Schauer et al., 2002; Bartel, 2004)。miR172、miR164和miR166通过调控靶基因AP2、CUCs、PHV和PHB直接或间接控制顶端分生组织形成、分化和胚胎发生(Vernoux and Benfey, 2005; Williams et al., 2005)。水稻(*Oryza sativa*)分生组织

收稿日期: 2012-04-06; 接受日期: 2012-07-10

基金项目: 国家自然科学基金(No.30830086)和国家基础研究发展计划(No.2009CB119100)

* 通讯作者。E-mail: lwqi@caf.ac.cn

分化前后, miR156、miR319和miR397表达差异显著(Luo et al., 2006)。甜橙(*Citrus sinensis*)体胚发生过程中, miR156、miR168和miR171在诱导时期起作用; miR159、miR164、miR390和miR397影响球形胚形成; miR166、miR167和miR398参与子叶胚发生(Wu et al., 2011)。植物miRNA通过抑制分化促进转录因子的过早表达, 调控胚胎发育时序, 如miR156通过作用于 *SPL10* 和 *SPL11* 调控胚胎正常发育(Nodine and Bartel, 2010; Willmann et al., 2011)。miRNA除了调控转录因子, 也直接作用于某些功能蛋白质, 如miR397调节Laccase含量(Sunkar and Zhu, 2004), 参与细胞壁加厚与木质化(Luo et al., 2006); miR398靶向作用于 *CSDs* (Jones-Rhoades and Bartel, 2004)和Cytochrome oxidase (Sunkar et al., 2006), 调节铜动态平衡和应激干旱胁迫(Trindade et al., 2010); miR408的靶基因Laccase(Schwab et al., 2005)和Plantacyanin(Sunkar and Zhu, 2004)调控细胞壁增厚、光合系统间质子传递和应激干旱胁迫等(Trindade et al., 2010)。然而, miRNA在植物胚胎发育中的研究多集中于被子植物, 有关裸子植物尤其是针叶树报道较少。据报道, 火炬松(*Pinus taeda*)中雌配子体miR166和胚胎AGO9在胚胎成熟时为表达最高峰(Oh et al., 2008); 落叶松(*Larix leptolepis*) miR-171在胚性细胞期显著上调表达, miR159、miR169和miR172则显著下调, 暗示miRNA参与细胞胚性维持或胚性向非胚性转变过程(Zhang et al., 2010)。为进一步挖掘落叶松miRNA信息, 本课题组应用Solexa测定体细胞胚胎小RNA文库, 鉴定了35个家族83个保守miRNAs, 并发现了16个新miRNAs(Zhang et al., 2012)。

miRNA表达分析多集中在miRNA成熟体, 前体表达分析较少(Qin et al., 2011)。Qin等(2011)监测了胡杨(*Populus euphratica*)17个miRNA成熟体和14个前体在脱水和高盐胁迫下的表达响应。获得miRNA前体是表达分析的先决条件, 虽已有多种miRNA前体搜寻软件或方法(Huang et al., 2007), 但对于无基因组信息的裸子植物及一些EST信息匮乏的物种, 其miRNA前体序列的获得存在障碍。

本研究以落叶松miR156、miR166、miR397、miR398和miR408为研究对象, 通过克隆或比对获得了这5个miRNA前体并进行保守性分析; 然后预测靶基因并注释功能; 进而运用qRT-PCR分析miRNA成熟

体、前体和靶基因在落叶松体细胞胚胎的8个发育阶段的表达变化, 以期揭示miRNA表达、miRNA前体加工调控、miRNA与靶基因互作规律, 并为阐明miRNA在体细胞胚胎发生过程中的调控功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以日本落叶松(*Larix leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Gord.)体胚发生稳定的638[#]细胞系为研究材料, 根据形态解剖学特征划分为8个发育阶段, 依次为原胚团I(PEMI, 继代培养2天)、原胚团III(PEMIII, 继代培养15天)、早期单胚(成熟培养2天)、中期单胚(成熟培养6天)、后期单胚(成熟培养15天)、早期子叶胚(成熟培养24天)、中期子叶胚(成熟培养29天)和后期子叶胚(成熟培养39天)。实验材料用液氮速冻并保存于-70℃冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 miRNA及其前体获得

miRNA成熟序列从前期落叶松小RNA文库高通量测序结果中获得。序列如下: lle-miR156, UGACAGAA-GAGAGUGGGCAC; lle-miR166, UCGGACCAGG-CUUCAUUC CCC; lle-miR397, CAUUGAGUGCAG-CGUUGACGA; lle-miR398, CGUGUUC C CAGGU-CGCCCCAG; lle-miR408, UGCACUGCCUCUUC-CCUGGCU。miRNA前体序列获得方式包括: (1) miRNA成熟序列比对落叶松ESTs、二级结构分析、与miRBase中前体序列同源性分析; (2) 未比对上EST的miRNA, 前体序列通过RACE技术克隆获得。

1.2.2 miRNA靶基因预测

5个miRNA序列与落叶松ESTs上传至psRNATarget网页(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)。选择功能3和默认参数, 进行miRNA靶基因预测(Dai and Zhao, 2011), 并在Uniprot注释其功能(<http://www.uniprot.org/>)。

1.2.3 miRNA前体序列的克隆

用总RNA纯化试剂盒(NORGEN biotek corporation, 加拿大)提取落叶松体细胞胚胎8个发育阶段材料总

RNA, 操作过程参照说明书。用ND-1000和1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA浓度和质量。将总RNA等量混合, 用Oligotex mRNA Kit (Qiagen, 德国)富集Poly (A)⁺mRNA, 用SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成5'/3'-RACE cDNA, 具体操作步骤参照说明书。将cDNA稀释20倍后, 用Hot start EX Taq polymerase(宝生物, 大连)进行PCR反应, 将扩增产物连接到pEASY-T3克隆载体(全式金, 北京), 转化*Trans1-T1*感受态细胞(全式金, 北京)。37°C过夜培养, 挑取单克隆摇菌, 进行PCR验证并测序。

1.2.4 miRNA前体的qRT-PCR定量分析

用总RNA纯化试剂盒提取总RNA, RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, 上海)去除基因组DNA, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EU)反转录, cDNA稀释5倍用于定量分析。应用引物设计软件Primer Premier 5.0设计定量引物, 分别为: pre-miR156F, 5'-GTGGGCACACATAACCCCTAA-C-3'; pre-miR156R, 5'-GAAAGAGACGTGAGCAC-GCAT-3'; pre-miR166F, 5'-GGTGTTTTTGGGGCC-GATAAA-3'; pre-miR166R, 5'-GAATGAAGCCTG-GTCCGACG-3'; pre-miR397F, 5'-CGTTGACGAT-AAACAAATCCTCC-3'; pre-miR397R, 5'-CATGGC-ACTCCACAGAGATAGAT-3'; pre-miR398F, 5'-AC-ACATTCCATTACAGTGTCGTG-3'; pre-miR398R, 5'-GTCCACATTCTCATCTGCGTCA-3'; pre-miR-408F, 5'-GGATGAGTTAGGGCATGGGAG-3'; pre-miR408R, 5'-TGAGAATGGCAGAAGCAGACG-3'。应用SYBR Premix EX Taq Kit (宝生物, 大连)在ABI-7500 定量仪器(美国)上进行RNA前体的定量分析, 具体反应体系和步骤参照说明书。PCR反应结束后, 用溶解曲线和2%琼脂糖凝胶电泳验证产物特异性。每个样品设3次重复。在前期的筛选与分析后, 选择*EF-1*为内参基因(*EF-1F*, 5'-TACTGCACTGTG-ATTGATGCC-3'; *EF-1R*, 5'-CATCCATCTTGTTAC-AGCAGC-3')(Schwarzerová et al., 2010)。

1.2.5 miRNA成熟体的qRT-PCR定量分析

用Small RNA Isolation Kit(百泰克, 北京)提取落叶松体胚发生过程中8个发育阶段材料的小RNA, 用ND-

1000和15%变性PAGE胶检测小RNA的浓度和质量。用NCode VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, 美国)将小RNA加A反转录成cDNA, 稀释20倍后用于miRNA定量分析。反向引物为试剂盒中的通用定量引物(Invitrogen)。正向引物分别为: miR156F, 5'-GATGACAGAAGAGAGTGGGCACA-3'; miR166F, 5'-GACCAGGCTTCATTCCCCAA-3'; miR397F, 5'-ATTGAGTGCAGCGTTGACGAA-3'; miR398F, 5'-TGTTCCCAGGTGCGCCCAGAA-3'; miR408F, 5'-CACTGCCTCTTCCCTGGCTAA-3'。定量分析所用试剂和步骤同1.2.4节所述。在前期的筛选与分析后, 选择5.8S rRNA为内参基因, 正向引物为5'-GTCTG-TCTGGGCGTCGCATAA-3'。

1.2.6 miRNA靶基因的qRT-PCR定量分析

RNA提取、DNA去除及反转录等参照1.2.4节。应用引物设计软件Primer Premier 5.0设计定量引物, 分别为: QTmiR156F, 5'-CTGAAGGGGACTTAGCAA-CTGG-3'; QTmiR156R, 5'-CCCAACTACCCTCTG-GCACTC-3'; QTmiR166F, 5'-CAGAGGAGACTTT-GACGCAG-3'; QTmiR166R, 5'-CAGAACATCCAA-GCACCGACA-3'; QTmiR397F, 5'-GCTGTAAAC-AAGGAGAAACG-3'; QTmiR397R, 5'-GTCTTGTA-TGGTTTGGTGTAGCA-3'; QTmiR398F, 5'-GGTG-TTAGGGTTTGGGTTGG-3'; QTmiR398R, 5'-ATG-GTCCATCCTGAGCTTCC-3'; QTmiR408F, 5'-CA-GAATAGTGGTGGGGGGAA-3'; QTmiR408R, 5'-T-GTCGCTACCAGAAGTGAGAGG-3'。定量所用试剂、步骤和内参基因选择等同1.2.4节所述。

1.2.7 统计学分析

应用SPSS软件进行统计学分析, 包括采用双变量相关模式分析miR398和miR408成熟体的表达相关性, miRNA与其靶基因相关性分析。采用回归分析中的曲线估算分析miRNA成熟体与其前体的表达关系。

2 结果与讨论

2.1 miRNA前体的获得及分析

Ile-miR398比对到一条落叶松EST(JR165099), 经

表1 5个落叶松miRNA的靶基因预测

Table 1 Target prediction of five larch miRNA

miRNA	Target gene (mismatch)	Function annotation	Score/Expect
miR156	JR158379 (3.0)	GQ04008_M09 mRNA (<i>Picea glauca</i>)	370(410)/4e-99
miR166	JR140760 (1.5)	Class III HD-Zip (<i>Picea glauca</i>)	1 532(1 698)/0.0
	JR163822 (2.5)	Laccase (<i>Pinus radiata</i>)	241(266)/5e-60
	JR147962 (3.0)	Laccase (<i>Pinus taeda</i>)	210(534)/7e-63
miR397	JR160714 (2.0)	Laccase (<i>Ricinus communis</i>)	84.2(92)/8e-13
	JR143920 (3.0)	Phytocyanin (<i>Pinus taeda</i>)	832(922)/0.0
miR398	JR166406 (3.0)	60S ribosomal protein (<i>Picea abies</i>)	919(1 018)/0.0
miR408	JR167856 (2.0)	Plastocyanin (<i>Oryza sativa</i>)	130(328)/5e-36

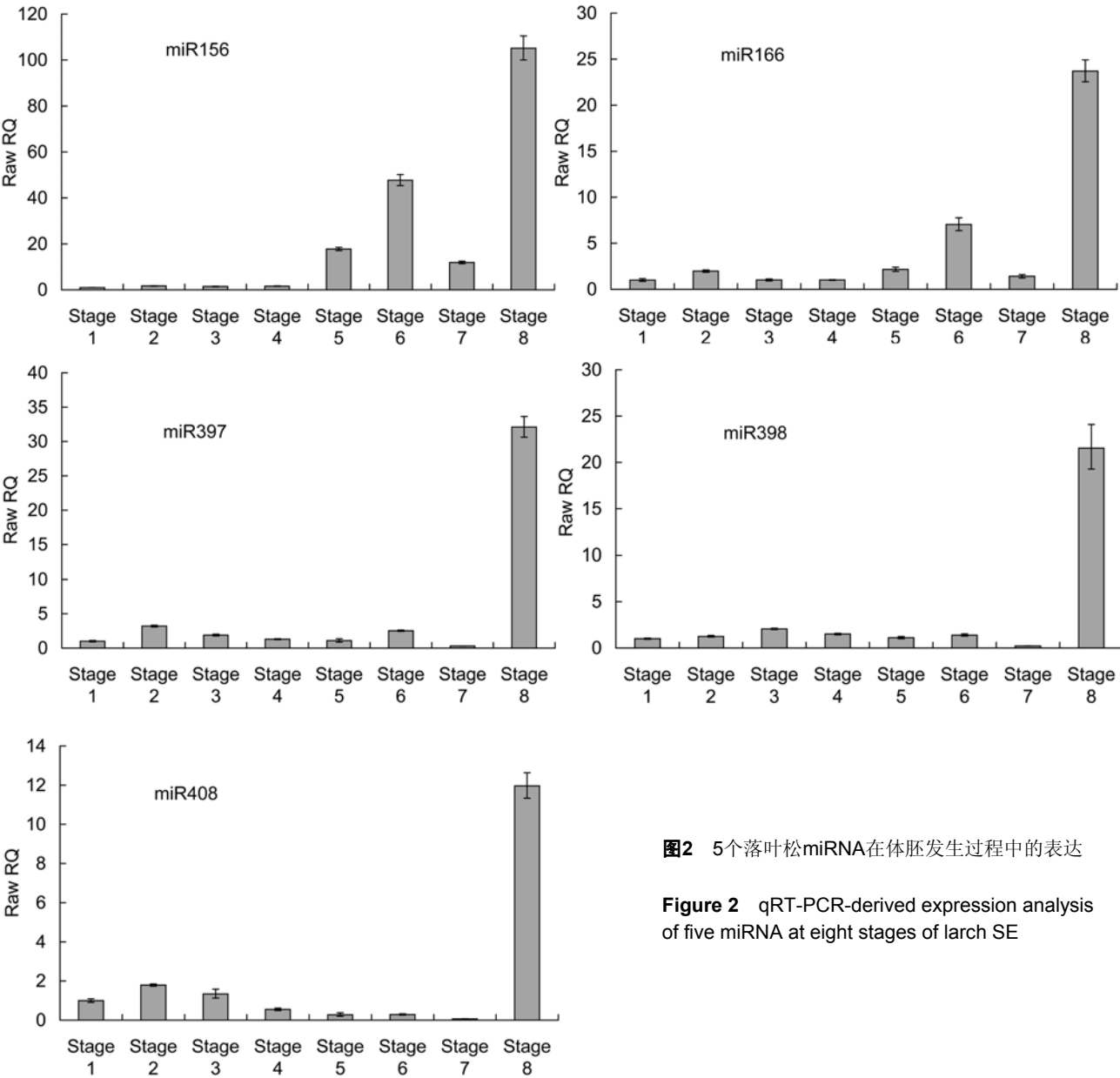


图2 5个落叶松miRNA在体胚发生过程中的表达

Figure 2 qRT-PCR-derived expression analysis of five miRNA at eight stages of larch SE

丰度在前4个阶段变化不大,在后期单胚、早期子叶胚阶段显著持续升高,在中期子叶胚降低,但在后期子叶胚急剧升高至表达最高峰;miR166从PEMI至PEMIII上调表达,而早期单胚、中期单胚阶段表达水平降至PEMI,但在后期单胚阶段升高,表达次高峰出现在早期子叶胚,在中期子叶胚降低,并于后期子叶胚阶段急剧升高至最高峰;miR397表达水平在继代培养中显著上升,表达次高峰出现在PEMIII,单胚3个阶段逐渐降低,而在早期子叶胚升高,于中期子叶胚降至最低水平,但在后期子叶胚显著升高;miR398表达水平在前3个阶段逐渐升高,表达次高峰出现在早期单胚阶段,在中后期单胚降低,在中期子叶胚降至最低水平,但在后期子叶胚急剧升高至最高值;miR408表达模式与miR398相似($r=0.992$, $P<0.01$),其表达次高峰在PEMIII,比miR398略提前。

2.4 落叶松体胚发生过程中miRNA前体的表达

为分析miRNA前体在落叶松体胚发生过程中的表达模式,采用qRT-PCR实时监测5个miRNA前体在体胚8个发育阶段的表达变化。如图3所示,miRNA前体表达模式不同于miRNA,其变化幅度小于成熟体。具体表现为:miR156前体水平在前7个阶段逐渐升高,表达最高峰在中期单胚,在后期单胚降低,但仍保持较高水平,呈升-降模式;miR166前体表达次高峰在PEMIII,单胚阶段逐渐降低,早期子叶胚期升高,中期子叶胚期降至最低值,但在后期子叶胚上升至最高峰,呈升-降-升-降-升模式;miR397前体表达水平在PEM保持稳定,单胚阶段逐渐降低,最低峰在后期单胚,在子叶胚阶段逐渐升高,最高峰出现在后期子叶胚,呈降-升模式;miR398和miR408前体丰度均在前5个阶段逐渐降低,最低值出现在后期单胚,在早期子叶胚显著升高,在中期子叶胚略有降低,并在后期子叶胚急剧升高至最高峰,呈降-升模式。

2.5 miRNA成熟体与前体的关系

miR156成熟体和前体表达水平在体胚发育前6个阶段逐渐升高,miR156前体在中期子叶胚继续升高,而成熟体降低,但在后期子叶胚,成熟体急剧升高,前体降低。miR166成熟体与前体在前4个阶段变化模式相同,后期单胚至后期子叶胚,miR166成熟体与前体仍有相似的表达模式,但成熟体变化幅度远大于前

体。miR397成熟体和前体在前5个阶段有相同变化模式,而在中期子叶胚,前体升高,但成熟体降低,后期子叶胚阶段,前体稍微上升,成熟体急剧升高。miR398和miR408前体在前5个阶段逐渐降低,成熟体表达次高峰分别在早期单胚和PEMIII,子叶胚阶段成熟体与前体变化模式相同。

回归分析表明,miRNA成熟体丰度与前体表达量不呈线性相关。比较各种估计模型的决定系数 R^2 、标准误和 F 值,miR166、miR397、miR398和miR408前体和成熟体表达量拟合程度最好,为Cubic三次多项式,而miR156相对较好,为Power幂函数,但未达到显著水平(表2)。

2.6 落叶松体胚发生过程中miRNA靶基因的表达

为验证预测的靶基因,我们运用qRT-PCR技术监测了5个miRNA潜在靶基因在落叶松体胚8个发育阶段的表达分析。如图4所示,5个潜在靶基因表达模式不同。miR156靶基因(一个未知mRNA)表达在前5个阶段保持相对稳定水平,在早期子叶胚急剧降低,后期子叶胚含量最低。miR166靶基因(HD-Zip)表达模式呈双峰,表达最高峰和次高峰分别在早期子叶胚和中期单胚,后期单胚阶段表达水平最低。miR397靶基因(Laccase)表达最高峰在中期单胚,在中期子叶胚略有升高,而在后期子叶胚为最低水平。miR398靶基因(Phytoeyanin)和miR408靶基因(Plastocyanin)表达最高峰均出现在后期单胚,但两者表达模式略有不同。

相关性分析表明,5对miRNA-靶基因mRNA表达均为负相关。然而,仅miR156与靶基因间的负相关性达到显著水平。另外,在某些发育阶段,靶基因与miRNA表达趋势相同,存在“共表达现象”。例如,miR156含量与其靶基因水平在中期单胚向后期单胚过渡时共同升高;miR166与其靶基因在后期单胚向早期子叶胚发育时共同升高。

2.7 讨论

2.7.1 MIR基因的进化特性

目前公认20个miRNA家族在陆地植物中保守,其靶基因亦保守(Jones-Rhoades et al., 2006)。然而,虽然miRNA成熟体在植物间高度相似,但是miRNA前体中非成熟序列在物种间存在实质性差异,这与亲缘关系有关(图1)。例如,miR166或miR408成熟序列在

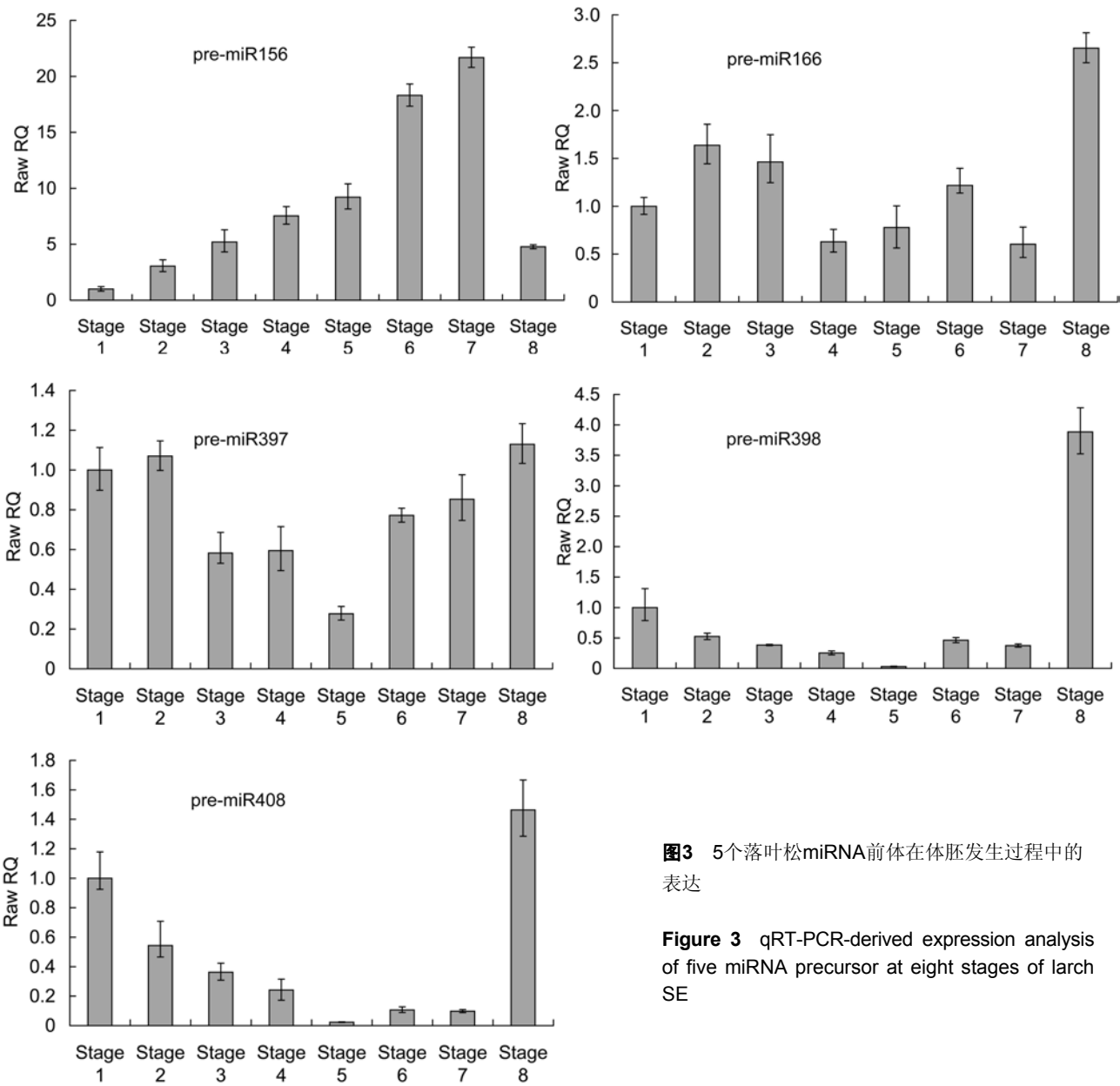


图3 5个落叶松miRNA前体在体胚发生过程中的表达

Figure 3 qRT-PCR-derived expression analysis of five miRNA precursor at eight stages of larch SE

表2 miRNA成熟体与前体的回归分析

Table 2 Regression analysis of mature and precursor miRNA by curve estimation

miRNA	R square	Significance	Regression equation
miR156	0.312	0.150	$y=1.073x^{1.011}$
miR166	0.945	0.006	$y=-19.899+57.301x-45.137x^2+11.211x^3$
miR397	0.728	0.125	$y=-64.841+399.718x-694.13x^2+363.192x^3$
miR398	0.995	0.000	$y=1.109+1.142x-2.052x^2+0.801x^3$
miR408	0.984	0.000	$y=-0.676+13.849x-29.492x^2+17.687x^3$

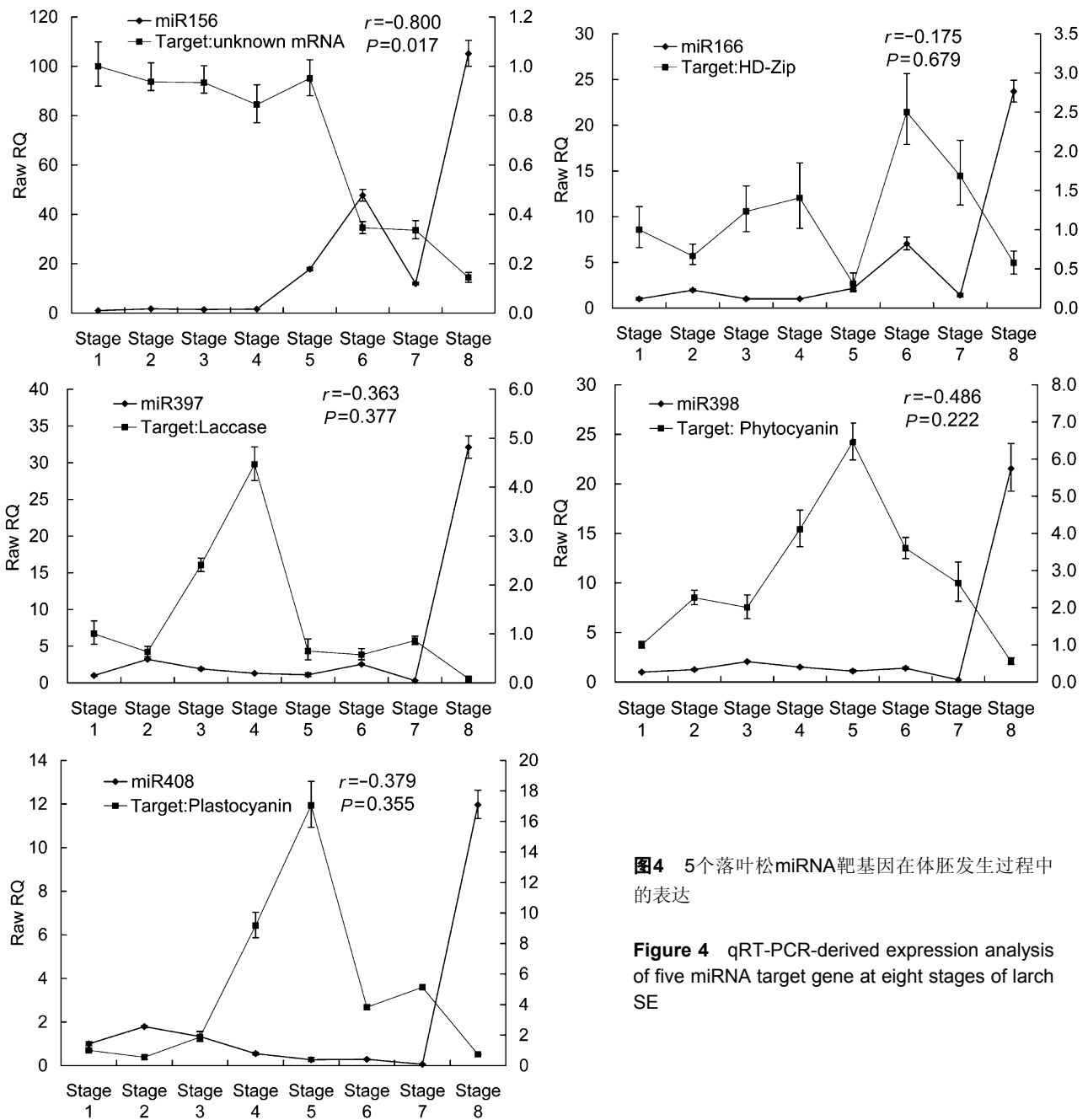


图4 5个落叶松miRNA靶基因在体胚发生过程中的表达

Figure 4 qRT-PCR-derived expression analysis of five miRNA target gene at eight stages of larch SE

落叶松、火炬松或拟南芥中相同, 但Ile-MIR166非成熟序列与ath-MIR166b(拟南芥中相似度最高)或Ile-MIR408与ath-MIR408不仅有碱基差异, 而且长度也不同, 发生了插入/缺失突变, 而与pta-MIR166或pta-MIR408相似度高, 仅几个碱基差异。这种现象不是随机发生的, 可能是自然选择过程中突变积累并固定的结果。研究表明, miRNA基因与蛋白质编码基因一样,

受到达尔文正选择影响, 发生快速进化(Chen and Rajewsky, 2007)。miRNA基因由靶基因反向重复进化而来(Allen et al., 2004); 也有假设认为与靶基因的协同作用是miRNA基因进化的主要来源(Li and Mao, 2007)。因此, miRNA基因经长期进化, 成熟序列和miRNA*承受选择压力而在进化中保持不变, 而其它序列因受选择压力较小, 在长期进化历程中积累突变。

2.7.2 miRNA在体胚发育中的调控功能

Nordine和Bartel(2010)认为植物miRNA通过抑制分化促进转录因子过早表达,从而调控胚胎发育时序。miRNA表达水平在各发育阶段动态变化(Wu et al., 2011),对胚胎各个发育阶段miRNA及其靶基因的表达分析可揭示miRNA在胚胎发育中的调控作用。本研究表明,5个miRNA及其靶基因在落叶松体胚发生过程中表达模式不同(图2)。miR156在前4个阶段表达相对稳定,而在后期单胚和早期子叶胚急剧升高,对应地,预测的靶基因(未知mRNA)表达呈显著负相关。研究表明miR156在拟南芥胚胎八细胞时期抑制SPL转录因子,阻止应在胚胎成熟时期表达的基因转录物提前积累,实现胚胎正常发育(Nordine and Bartel, 2010)。因此,miR156含量在后期单胚和早期子叶胚急剧升高,可能抑制落叶松胚胎成熟时期表达基因的过早积累,调控体胚正常发育时序。miR166丰度在后期单胚上调表达,次高峰在早期子叶胚。miR166调控HD-ZIP转录因子,控制顶端分生组织形成(Williams et al., 2005),HD-ZIP表达最高峰在早期子叶胚(与miR166共表达),而在中期和后期子叶胚降低。因此,早期子叶胚中miRNA与其靶基因的共表达可能参与子叶形成时顶端分生组织的维持。miR397靶基因漆酶可能参与细胞次生长细胞壁的木质化和加厚(Constabel et al., 2000; Luo et al., 2006)。胚性细胞由许多未分化薄壁细胞组成,miR397在继代培养中上调表达,而Laccase含量降低,miR397在单胚阶段逐渐降低,而靶基因表达最高峰在中期子叶胚,此时可能经历了一次细胞壁的加厚,因此miR397通过调节Laccase进而调控细胞壁厚度。miR398和miR408靶基因分别为Phytocyanin和Plastocyanin,同属含铜蛋白,参与质子传递和干旱胁迫应激(Trindade et al., 2010)。2个miRNA和其靶基因表达模式一致($r_1=0.992$, $P_1<0.01$; $r_2=0.932$, $P_2=0.001$)。miR398和miR408表达最高峰在后期子叶胚,次高峰分别在早期单胚和PEMIII,而靶基因表达最高峰在后期单胚,最低值在后期子叶胚。这2个miRNA在早期单胚以后的发育阶段表达下调,为后期单胚的靶基因积累创造了环境。

2.7.3 落叶松体胚发育中miRNA前体的动态表达及成熟体的表达

miRNA表达分析集中于miRNA成熟体,而有关mi-

RNA前体报道较少(Qin et al., 2011)。在落叶松体细胞胚胎整个发育过程中进行miRNA前体的表达分析,同时结合miRNA成熟体的表达变化,可以揭示体胚发育中miRNA产生、加工过程的调控。miRNA成熟体和前体含量回归分析表明,miRNA成熟体丰度与前体表达量不呈线性相关,其中miR166、miR397、miR398和miR408前体和成熟体表达量拟合程度最好,为Cubic三次多项式,而miR156相对较好,是Power幂函数(表2)。miR166成熟体与前体在前4个阶段表达模式相同,暗示miR166成熟体含量在此阶段主要受前体丰度调控,即MIR基因转录水平的调控;后期单胚和子叶胚期其表达模式虽相似,但成熟体变化幅度远大于前体,可能与miRNA前体的相对不稳定有关。已有研究表明,miRNA前体比成熟体更容易降解(Schmittgen et al., 2008)。miR397成熟体和前体在前6个阶段表达模式相似,表明miR397成熟体可能受MIR基因转录水平调控;miR397在中期子叶胚前体水平升高,但成熟体含量降低,说明此阶段miR397成熟体含量可能受加工调控。miR398和miR408前体在前5个阶段逐渐降低,而成熟体表达次高峰分别出现于早期单胚和PEMIII,说明miRNA成熟体积累稍晚于前体,可能受加工过程调控或与miRNA前体的相对不稳定有关;在子叶胚3个发育阶段,miRNA成熟体与前体表现相同的变化模式,说明miR398和miR408成熟体在这3阶段的积累可能主要受前体丰度影响。落叶松早期子叶胚发生前6个阶段,miR156前体和成熟体表达水平逐渐升高,暗示miR156成熟体丰度主要受MIR基因转录水平的调控;在中期子叶胚miR156前体含量继续升高,但成熟体水平降低,表明此阶段miR156成熟体丰度可能受加工过程调控以及DCL1水平降低或miR156成熟体降解等影响。另外,miRNA成熟体与前体含量的非线性相关,多呈Cubic三次多项式,成熟miRNA丰度变化远大于前体,这可能由于保守miRNA呈家族式存在,成熟体间高度相似或完全相同,而前体序列不同。因此一个成熟体miRNA可能由多个前体产生。

本研究分析了落叶松miRNA前体在物种间的保守性,但因基因组信息的缺乏和ESTs信息限制,仍有许多miRNA前体需要鉴定。miRNA、前体和靶基因在体胚发育各个阶段呈动态表达,miR156、miR166、miR397和miR398/miR408及其靶基因表达

模式不同, 暗示这些miRNA在体细胞胚胎发生过程中起不同调控作用。然而, miRNA成熟体丰度与前体含量并不呈简单线性相关, 表明miRNA成熟体的积累可能同时受*MIR*基因转录水平、miRNA前体降解水平和*DCL1*加工等多层次调控。

参考文献

- Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **36**, 1282–1290.
- Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng ZP, Zamore PD (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* **328**, 1534–1539.
- Arvey A, Larsson E, Sander C, Leslie CS, Marks DS (2010). Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Mol Syst Biol* **6**, 363–363.
- Baccarini A, Chauhan H, Gardner TJ, Jayaprakash AD, Sachidanandam R, Brown BD (2011). Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Curr Biol* **21**, 369–376.
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297.
- Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 3468–3473.
- Carrington JC, Ambros V (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336–338.
- Chatterjee S, Grosshans H (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **461**, 546–549.
- Chen K, Rajewsky N (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Net Rev Genet* **8**, 93–103.
- Chugh A, Khurana P (2002). Gene expression during somatic embryogenesis: recent advances. *Curr Sci* **83**, 715–730.
- Constabel CP, Yip L, Patton JJ, Christopher ME (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* **124**, 285–295.
- Cruz-Gallardo I, Díaz-Moreno I, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA (2011). The cytochrome f-plastocyanin complex as a model to study transient interactions between redox proteins. *FEBS Lett* **586**, 646–652.
- Dai X, Zhao PX (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res* **39**, W155–W159.
- Fletcher JC, Eshed-Williams L, Grigg SP, Xie MT, Christensen S (2006). MicroRNA regulation of plant stem cell populations. *Dev Biol* **295**, 331–331.
- Huang TH, Fan B, Rothschild MF, Hu ZL, Li K, Zhao SH (2007). MiRFinder, an improved approach and software implementation for genome-wide fast microRNA precursor scans. *BMC Bioinformatics* **8**, 341.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**, 787–799.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 19–53.
- Li AL, Mao L (2007). Evolution of plant microRNA gene families. *Cell Res* **17**, 212–218.
- Llave C, Xie ZX, Kasschau KD, Carrington JC (2002). Cleavage of *Scarecrow-like* mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **297**, 2053–2056.
- Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* **10**, 1174–1177.
- Luo YC, Zhou H, Li Y, Chen JY, Yang JH, Chen YQ, Qu LH (2006). Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development. *FEBS Lett* **580**, 5111–5116.
- Ma HL, Zhao HM, Liu Z, Zhao J (2011). The phytochrome gene family in rice (*Oryza sativa* L.), genome-wide identification, classification and transcriptional analysis. *PLoS One* **6**, e25184.
- McHale NA, Koning RE (2004). MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana glauca* *PHAVOLUTA* mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell* **16**, 1730–1740.
- Nordine MD, Bartel DP (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev* **24**, 2678–2692.
- Oh TJ, Wartell RM, Cairney J, Pullman GS (2008). Evidence for stage-specific modulation of specific microRNAs (miRNAs) and miRNA processing components in zygotic embryo and female gametophyte of loblolly pine (*Pinus taeda*). *New Phytol* **179**, 67–80.
- Park S, Harada JJ (2008). Arabidopsis embryogenesis.

- Methods Mol Biol* **427**, 3–16.
- Pawlicki JM, Steitz JA** (2008). Primary microRNA transcript retention at sites of transcription leads to enhanced microRNA production. *J Cell Biol* **182**, 61–76.
- Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N** (2003). Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Rep* **21**, 747–758.
- Qin YR, Duan ZX, Xia XL, Yin WL** (2011). Expression profiles of precursor and mature microRNAs under dehydration and high salinity shock in *Populus euphratica*. *Plant Cell Rep* **30**, 1893–1907.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**, 1616–1626.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A** (2002). *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci* **7**, 487–491.
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang JM, Sarkar A, Yang LQ, Elton TS, Chen C** (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* **44**, 31–38.
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8**, 517–527.
- Schwarzerová K, Vondráková Z, Fischer L, Bořiková P, Bellinvia E, Eliášová K, Havelková L, Fišerová J, Váagner M, Opatrný Z** (2010). The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biol* **10**, 89.
- Song L, Axtell MJ, Fedoroff NV** (2010). RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in Arabidopsis. *Curr Biol* **20**, 37–41.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK** (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* **18**, 2051–2065.
- Sunkar R, Zhu JK** (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2001–2019.
- Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, dos Santos DM** (2010). miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* **231**, 705–716.
- Vernoux T, Benfey PN** (2005). Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 388–394.
- Williams L, Grigg SP, Xie MT, Christensen S, Fletcher JC** (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes. *Development* **132**, 3657–3668.
- Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD** (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**, 1871–1884.
- Wu XM, Liu MY, Ge XX, Xu Q, Guo WW** (2011). Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* **233**, 495–505.
- Xie ZX, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC** (2005). Expression of Arabidopsis *miRNA* genes. *Plant Physiol* **138**, 2145–2154.
- Zhang JH, Zhang SG, Han SY, Wu T, Li XM, Li WF, Qi LW** (2012). Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* **236**, 647–657.
- Zhang SG, Zhou J, Han SY, Yang WH, Li WF, Wei HL, Li XM, Qi LW** (2010). Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochem Biophys Res Commun* **398**, 355–360.

Expression Analysis of Five MiRNAs and Their Precursors During Somatic Embryogenesis in Larch

Junhong Zhang^{1,2}, Shougong Zhang¹, Tao Wu¹, Suying Han³, Wenhua Yang¹, Liwang Qi^{1*}

¹Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China

³Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract We used the homolog search strategy or RACE to obtain 5 precursor microRNAs (miRNAs) of larch, *Larix leptolepis*. Mature miRNAs shared high similarity among plant species, and non-mature sequences showed distinct similarity related to genetic relationships. Expression profiles of the 5 precursor and mature miRNAs were examined during 8 developmental stages with quantitative RT-PCR. The expression of precursor and mature miRNAs changed dynamically during developmental stages, with major peaks in expression for mature miRNAs in late cotyledonous embryos, which might be associated with promoting embryo dormancy. However, miR397 and miR408 showed minor peaks in expression at PEMIII, miR398 at the early single embryo stage, and miR156 and miR166 at the early cotyledonous embryo stage, which might be related to regulation to maintain a thin cell wall, proton transfer between photo systems, and formation of shoot meristem. However, the expression of mature miRNAs was not linearly associated with that of precursor miRNAs, which might be regulated at several levels. Our study sheds light on miRNA evolution, expression regulation of mature miRNAs, and regulation of somatic embryogenesis in larch.

Key words expression analysis, *Larix leptolepis*, mature miRNA, precursor miRNA, somatic embryogenesis

Zhang JH, Zhang SG, Wu T, Han SY, Yang WH, Qi LW (2012). Expression analysis of five miRNAs and their precursors during somatic embryogenesis in larch. *Chin Bull Bot* 47, 462–473.

* Author for correspondence. E-mail: lwqi@caf.ac.cn