

# 麻竹 *miR172a* 靶基因 *DIAP2* 的克隆及其表达

高志民<sup>1</sup>, 娄永峰<sup>1</sup>, 王丽丽<sup>1</sup>, 杨丽<sup>1</sup>, 赵韩生<sup>1</sup>, 陈东亮<sup>1,2\*</sup>

(1. 国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102; 2. 北京市农林科学院生物中心, 北京 100097)

**摘要:** 为了解开花麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)的 *DIAP2* 基因功能, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了 *miR172a* 靶基因 *AP2* 同源序列 cDNA 全长, 命名为 *DIAP2*。结果表明, *DIAP2* 基因 cDNA 全长为 1729 bp, 包含 5' 端非编码区 81 bp、开放阅读框 1464 bp、3' 端非编码区 160 bp 和 24 个碱基的 Poly A 尾巴, 在编码框靠近 3' 端 130 bp 处有 1 个高度匹配 *miR172a* 的结合位点(CTGCAGCATCATCAGGATTCT)。*DIAP2* 编码 487 个氨基酸的蛋白, 具有两个 AP2 结构域, 属于 AP2/ERF 家族 AP2 亚家族的 AP2 组, 与来自其它单子叶植物的 AP2 蛋白均有较高同源性。RLM-5' RACE 分析表明, *miR172a* 主要在靶序列的第 11~12 个碱基之间剪切靶基因 *DIAP2* 的 miRNA。qRT-PCR 结果表明, 麻竹花芽中 *DIAP2* 基因的表达规律与 *miR172a* 表达变化正好相反, 证明 *miR172a* 对 *DIAP2* 基因的表达具有调控作用。

**关键词:** 麻竹; *AP2* 基因; *miR172a*; 基因表达

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.003

## Cloning and Expression Analysis of *miR172a* Targeted Gene *DIAP2* in *Dendrocalamus latiflorus*

GAO Zhi-min<sup>1</sup>, LOU Yong-feng<sup>1</sup>, WANG Li-li<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, ZHAO Han-sheng<sup>1</sup>, CHEN Dong-liang<sup>1,2\*</sup>

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing 100097, China)

**Abstract:** In order to understand the function of *DIAP2* in *Dendrocalamus latiflorus*, one *miR172a* targeted gene named as *DIAP2* was cloned from *D. latiflorus* by RT-PCR and RACE. Sequence analysis showed that the full length cDNA of *DIAP2* was 1729 bp, including 5' untranslated region (UTR) 81 bp, open reading frame (ORF) 1464 bp, 3' UTR 351 bp, 24 bp polyA, and one *miR172a* complementary site (CTGCAGCATCATCAGGATTCT) at 130 bp of the 3' end in ORF. *DIAP2* encodes a putative protein with 487 amino acids with two AP2 domains, which indicate that it belongs to AP2 group of AP2 subfamily in AP2/ERF family. *DIAP2* has a high homology with those AP2 from other monocots. RLM-5' RACE analysis showed that *DIAP2* was regulated by *miR172a* through cutting mainly at the site between the 11<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> bases. Real-time quantitative PCR results showed that the expression pattern of *DIAP2* was opposite to that of *miR172a* in flower buds. These validated that *miR172a* played a regulatory role in regulating the expression of *DIAP2*.

**Key words:** *Dendrocalamus latiflorus*; *AP2* gene; *miR172a*; Gene expression

竹子开花调控研究一直倍受关注, 借助分子生物学手段从分子水平揭示其调控机制已成为研究热点之一。目前对竹子花发育相关基因的研究

已有一些报道, 如麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)的 MADS-box 基因 *DIMADS18* 可能参与麻竹开花时间的调控<sup>[1]</sup>; 绿竹(*Bambusa oldhamii*)的 *MADS1* 属于

收稿日期: 2014-09-18 接受日期: 2014-11-14

基金项目: 国家林业局 948 项目(2011-4-55)资助

作者简介: 高志民(1971~), 男, 博士, 研究员, 主要从事生物技术与功能基因组学研究。E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dlchen984@126.com

E类功能基因,对花分生组织起调控作用<sup>[2]</sup>;早竹(*Phyllostachys praecox*)的 *MADS1* 和 *MADS2* 参与花早期发育,还与小花的雄蕊发育有关<sup>[3]</sup>;毛竹(*P. edulis*)的 *MADS1* 可能参与由营养生长转向生殖生长的发育调控<sup>[4]</sup>;毛竹 *PeAP2* 基因为组成型表达,可能在毛竹的生长发育及信号转导等过程中均具有重要的调节作用<sup>[5]</sup>。通过对毛竹开花转录组的研究,揭示出干旱是诱导毛竹开花的重要因素<sup>[6]</sup>,同时证明环境胁迫和 GA 信号传导与毛竹开花具有潜在的关联<sup>[7]</sup>。

APETALA2 (AP2)转录因子主要参与植物的生长、发育以及多种生理生化反应,如调控花、分生组织、胚珠和种子发育<sup>[8-10]</sup>。AP2 基因属于花发育模型中的 A 类功能基因,参与花萼和花瓣的发育调控,并调控着与花分生组织启动有关的基因。同时,AP2 基因自身表达又受到 *miR172* 的调控,如在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)营养生长向生殖生长转换的过程中,AP2 转录因子基因 *TOE1*、*TOE2*、*SNZ* 和 *SMZ* 均受到 *miR172* 的调控<sup>[11]</sup>。*miR172* 是通过降解靶 mRNA 和抑制其翻译两种方式来发挥功能<sup>[12-14]</sup>。本研究以麻竹为材料,在分离 AP2 同源基因的基础上,通过 FLM-PCR 技术分析 *miR172* 对其 mRNA 的切割降解情况,并采用 qRT-PCR 技术对 *miR172* 及其靶基因的表达情况进行分析,以期揭示 *miR172* 及其靶基因在毛竹花发育过程中的表达调控提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)组培苗经过 2 年盆栽培养(光照  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,光/暗=16 h/8 h,温度 25℃),分别从开花植株和未开花植株上采取花芽、幼枝、叶片等材料。

### 1.2 基因克隆与分析

采用 Trizol 法分别提取麻竹 1.0 cm、1.5 cm、2.0 cm 花芽、开花幼枝、开花枝条顶端叶片、开花植株未开花枝条顶端叶片和未开花植株叶片的总 RNA<sup>[15]</sup>,按照反转录试剂盒(Promega 公司)和 SMART RACE 试剂盒(Clontech)分别合成 cDNA 和 RACE cDNA。

根据玉米(*Zea mays*)的 AP2 基因(EU974370)保

守区序列设计引物:DIAP2-F:5'-ATGGAGCTGGA-TCTGAACGTG-3' 和 DIAP2-R:5'-CGGCTTCTCT-ACCATTGCAT-3'。以麻竹叶片 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。电泳检测 PCR 产物,回收目的片段并连接到 pGEM-T easy 载体(Promega 公司),阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司(北京分公司)测序。根据获得的保守区序列设计 3' RACE 引物 3-1:5'-GATGGGAGGCTCGCATGGGCCAGT-TC-3';3-2:5'-GCGATCAAATGCAATGGTAGAGA-AGCCG-3' 和 5' RACE 引物 5-1:5'-GTGCAGGGT-GACGCCTCTGTATTTGGA-3';5-2:5'-GCCTGCG-GGAGCGGCAAGATTC TGATGT-3'。参考 SMART RACE 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。测序后获得 3' 和 5' 端序列,与保守区序列拼接获得基因的全长 cDNA 序列。

分别用 ProtScale<sup>[16]</sup>、SOMPA<sup>[17]</sup>、Motif Scan (在线分析软件)等分析获得基因编码蛋白的理化性质、预测结构和功能域。利用 NCBI 公共数据库进行 BLASTP 分析,采用 Mega 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建基于 AP2 同源蛋白序列的系统进化树。用在线软件 <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/> 预测 miRNA 靶点。

### 1.3 miR172a 介导靶基因的切割位点分析

根据靶基因预测剪切位点,在位点下游设计 5' RACE 引物 Outer primer 172F1:5'-CCAATCCACT-ACAAGAAACCACCCCGG-3' 和 Inner primer 172F2:5'-CTTCCCGGCAAATTTACAGTGTG-GC-3'。按照 TaKaRa 的 RLM-RACE 试剂盒(Full RACE Kit with TAP, Code No. 6107)操作说明,分别进行 RNA 纯化、RACE Adaptor 的连接、反转录,获得 RLM-RACE 的 cDNA,采用试剂盒提供的 5' RACE Outer Primer 与 172F1 配对进行 Outer PCR 反应,体系为 20  $\mu\text{L}$ :10 $\times$ GC Buffer II 2  $\mu\text{L}$ 、1 $\times$ cDNA Dilution Buffer II 8  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 、靶基因引物 172F1 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、5' RACE Outer Primer (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、*LA Taq* DNA 聚合酶 (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 5.75  $\mu\text{L}$ ;反应程序:先 94℃ 3 min;然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s,共 30 个循环。然后进行 Inner PCR 反应,体系为 20  $\mu\text{L}$ :5 $\times$ PrimerSTAR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 4  $\mu\text{L}$ 、dNTP mix (2.5 mmol L<sup>-1</sup> each) 1.6  $\mu\text{L}$ 、模板为 Outer PCR 反应液 1  $\mu\text{L}$ 、靶基因引物 172F2 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、5' RACE Inter

Primer ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ )  $1 \mu\text{L}$ 、PrimerSTAR HS DNA Polymerase ( $2.5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$   $11.2 \mu\text{L}$ ; 反应程序: 先  $98^\circ\text{C}$  3 min; 然后  $98^\circ\text{C}$  30 s,  $55^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 共 30 个循环。

#### 1.4 *miR172a*及其靶基因的表达分析

利用 qRT-PCR 方法检测 *miR172a* 及其靶基因在不同组织中的表达情况。采用茎环法<sup>[18]</sup>设计 *miR172a* 的反转录引物(5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTGCAGCA-3'), 并分别利用麻竹 1.0 cm、1.5 cm、2.0 cm 花芽、开花幼枝、开花枝条顶端叶片、开花植株未开花枝条顶端叶片和未开花植株叶片的总 RNA 反转录合成 miRNA 的 cDNA。设计 *miR172a* 定量引物 *miR172a*-F: 5'-AGCAGCATATATAGAATCCTGATG-3' 和 *miR172a*-R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3', 选用 U6 snRNA 为内参<sup>[19]</sup>; 靶基因定量引物 F1: 5'-TTACTGAAGT TGGTGCTGAAGGT-3' 和 R1: 5'-TTACTGAAGTTGGTGCTGAAGGT-3', 选用 *NTB* 基因为内参<sup>[20]</sup>, 引物序列由上海生工技术有限公司合成。

利用 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green 1 Master 试剂盒进行定量, 反应体系( $10 \mu\text{L}$ ): SYBR Green Mix ( $2\times$ )  $5 \mu\text{L}$ , 引物( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ )各  $0.4 \mu\text{L}$ , cDNA  $1 \mu\text{L}$  和  $\text{ddH}_2\text{O}$   $3.2 \mu\text{L}$ 。PCR 反应在 QTower 实时定量 PCR 仪(Aanalytikjena 公司)上进行, 反应程序: 先  $95^\circ\text{C}$  2 min; 然后  $95^\circ\text{C}$  30 s,  $58^\circ\text{C}$  60 s, 共 45 个循环。每个反应重复 3 次, 反应结束后应用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  算法进行分析<sup>[21]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 基因cDNA全长的获得

用引物 *DIAP2*-F 和 *DIAP2*-R 进行 PCR 扩增, 经测序获得了 990 bp 的序列。NCBI BLAST 分析表明, 该序列与水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)等单子叶植物的 *AP2* 基因有着较高的同源性, 初步确认为麻竹中 *AP2* 同源基因的部分序列。进一步通过 3' RACE 和 5' RACE 获得基因的 3' 和 5' 端序列, 并与保守区序列拼接, 去除重叠部分, 获得基因的全长 cDNA 序列为 1729 bp, 其中包括 5' 端非编码区 81 bp、开放阅读框 1464 bp、3' 端非编码区 160 bp 及 24 个碱基的

Poly A 尾巴, 在编码框靠近 3' 端 130 bp 处有 1 个高度匹配 *miR172a* 的结合位点(CTGCAGCATCATC-AGGATTCT)(图 1)。该基因编码含 487 个氨基酸的蛋白, 分子量为 52.75 kDa, 理论等电点为 6.859。BLASTP 分析表明, 该蛋白具有 2 个 AP2/ERF 结构域(图 1), 属于 AP2/EREBP 家族 AP2 亚家族的 AP2 组, 并且与来自其它单子叶植物的 AP2 蛋白均有着较高同源性, 因此将该基因命名为 *DIAP2* (GenBank 注册号: KM267641)。

### 2.2 *DIAP2*蛋白性质与结构预测

软件分析表明, *DIAP2* 编码的蛋白中含有强碱性氨基酸 56 个, 强酸性氨基酸 59 个, 疏水氨基酸 146 个, 极性氨基酸 119 个。蛋白亲水性 / 疏水性分析表明, *DIAP2* 具有较强的亲水性。

蛋白结构预测显示, *DIAP2* 蛋白除了含有两个 AP2/ERF 结构域, 还包含 1 个脯氨酸富集区域(第 103~148 位)和 1 个丝氨酸富集区域(第 444~483 位)。另外, 还含有 1 个酰胺化位点, 1 个 N 端糖基化修饰, 1 个依赖于 cAMP-和 cGMP-蛋白激酶磷酸化位点, 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 8 个 N-豆蔻酰化位点, 5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。*DIAP2* 蛋白共含有无规则卷曲、 $\beta$  折叠、延伸链和  $\alpha$  螺旋 4 种二级结构, 其中无规则卷曲最长, 覆盖了 64.68% 的氨基酸残基(315 个), 其次为  $\alpha$  螺旋结构覆盖了 97 个氨基酸残基(19.92%),  $\beta$  折叠和延伸链分别覆盖了 22 个(4.52%)和 53 个(10.88%)氨基酸残基。

按照同源建模的方法, 以拟南芥 *AtERF1* 的 GBD (GCC-box binding domain)蛋白的三维构型做模板(1gccA), 预测 *DIAP2* 蛋白的三维构型, 得到 *DIAP2* 蛋白中两个 AP2 结构域的三维结构, 与模板的相似度分别为 45.16% 和 32.79%, 具有 AP2 结构域典型的 3 个  $\alpha$  螺旋和 3 个  $\beta$  回转(图 2)。

### 2.3 同源性比较与系统进化树分析

经 NCBI BLASTP 分析, 在 NCBI 中与 *DIAP2* 蛋白一致性在 50% 以上的有 91 条同源序列, 其中与毛竹的 *AP2* (AGH68972)一致性最高(84.6%), 与模式植物水稻的转录因子 *AP2D23-like* (AAW78371)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *ARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED1* (NP\_001189625)的一致性分别为 75.1% 和 49.6%。构建基于不同



1 ACGCGGGGCTCTGGTTGTTGGGTTTGGGGTGTGATTGGGAGTTGGGATTGATCTTGGTTGAGGAGGTGGAGGAGGAGATGGAGCTGGATCTG  
M E L D L  
97 AACGTGGCGGACGGGGCGCGGAGAAGCCGGAAGCGATGGCGGGAGCGACTCCGGCACGTCGGACTCGCCGGTGTGAACGCGGAGGCGTCCGGC  
N V A D G A P E K P E A M A R S D S G T S D S P V L N A E A S G  
193 GGCGGAGGCGCCGCGGTGCGCCCGGAGGAGGGCTCAGCTCGACGCCCGCCGCTGGCGGTGCTCGAGTTCAGCATCATGAGGAGCTCGGGC  
G G G A A G A P A E E G S S S T P P P L A V L E F S I M R S S A  
289 TCGGCCGAGGGCGAGAAAGACGTGGGCGTTGCCGATGACGAGGAGGAGCCACGCCGTCGCCTCTGCGGCGGACGAGCTCGTACCCAGCAGCTC  
S A E G E K D V G V A D D E E E A T P S P L R R Q Q L V T Q Q L  
385 TTCCCGTTCGACGCCGCGCCCGCGGGCCCGTCCCGCAGCTGGGGCCGAGCTCGGGTCTTACGCCCCGAGCCCGCGGGCCCGCAGCCGGACATC  
F P V D A G P P R P V P Q P G A E L G F L R P E P P G P Q P D I  
481 AGAATCTTGGCGTCCCGCAGGCGCACGCGCCCGCGGCGCAGCGCAGGCTACCAAGAAGGCCCGCGGGCCCGCTCCCGCAGCTCGCAGTAC  
R I L P L P Q A H A P P A Q P Q A T K K S R R G P R S R S S Q Y  
577 CGCGGCTCACCTTCTACCGCCGACCGCGCGCTGGGAATCCATATTTGGGATTGCGGAAGCAAGTGTACTTAGGTGGATTGACACTGCTCAT  
R G V T F Y R R T G R W E S H I W D C G K Q V Y L G G F D T A H  
673 GCTGTGCAAGGCGTATGATCGAGCGCGATCAAGTTCGCGGCATCGACACGGACATAAACTTCGATCTTAGTGACTACGAGGACGACATGAAG  
A A A R A Y D R A A I K F R G I D T D I N F D L S D Y E D D M K  
769 CAGGTGAAGAGCCTATCCAAGGAGGAGTTCGTGCACGCTCTCGACGGCAGAGTACTGGCTTCTCGGAGGCAGCTCCAATACAGAGGCGTCACC  
Q V K S L S K E E F V H V L R R Q S T G F S R G S S K Y R G V I  
865 CTGCACAAGTGGCGCGATGGGAGGCTCGCATGGGCCAGTTCCTCGGAAGAAGTACATATATCTTGGGCTATTCGACAGCGAAGTAGAGGCTGCA  
L H K C G R W E A R M G Q F L G K K Y I Y L G L F D S E V E A A  
961 AGGGCTTATGATAAGGCTGCGATCAAATGCAATGGTAGAGAAGCCGTGACGAACTTCGAGCCTAGCACATATGATGGGAGATGCTTACTGAAGTT  
R A Y D K A A I K C N G R E A V T N F E P S T Y D G E M L T E V  
1057 GGTGCTGAAGGTGCAGATGTCGATCTGAACTTGAGCATATCTCAACCAGCTTTCGACAGCCCCAAAGGATAAGAAGTCCCTTGGTCTGCAGCTG  
G A E G A D V D L N L S I S Q P A L Q S P Q R D K N S L G L Q L  
1153 CACCATGGATTATTGATGGCTCTGAAGTGAAGAGCTAAGATTGATGCTCCCTCTGAACTGGCTGGCCGCCCTCATCGGTTCCCTCTTCTGACC  
H H G L F D G S E V K R A K I D A P S E L A G R P H R F P L L T  
1249 AAGCATCCACCAGTCTGGCTGCCAATCTCACCCATATTTCAAATAATGAGGATGCATCTAGAGATCATAACAGGAGGCCAGAGGGGAGCACC  
K H P P V W P A Q S H P I F S N N E D A S R D H N R R P E G S T  
1345 GGGGGTGTCCAGCTGGGCATGGAAAGTGAGCCACCTCCACCCACACTACCATTGCCGCTGTCTCGTCTGTCATCGTCATCCGCTGCAGCA  
G G V P S W A W K V S H P P P T L P L P L F S S L S S S S A A A  
1441 TCATCAGGATTCCTCAGAACCGTCAAGATAGCTATCTCCACCACCCATCGACCTCCCTCCAGTTCGACCCGATGGCGCCATCATCGTCAACCAC  
S S G F S R T V K I A I S T T P S T S L Q F D P M A P S S S N H  
1537 CACCGCTGAATAGAAGCCACACTGTAAATTTGCCGGGAAGCCGGCATCTTTTTCCCTCCGACGTTTCAACGTCTTCGGTTTGGCCGGGGTGG  
H R  
1633 TTTCTGTAGTGGATTGGATTTCATGACTGTATTTGCATGCTGCCAATTGAAAATGTTCTATTTGCACGCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图1 DIAP2 核酸序列及其推导出的氨基酸序列。\_\_\_\_:AP2/ERF 结构域; □:miR172a 结合位点。

Fig. 1 Nucleotide sequence of DIAP2 and deduced amino acid sequence. \_\_\_\_: AP2/ERF domains; □: miR172a binding site.

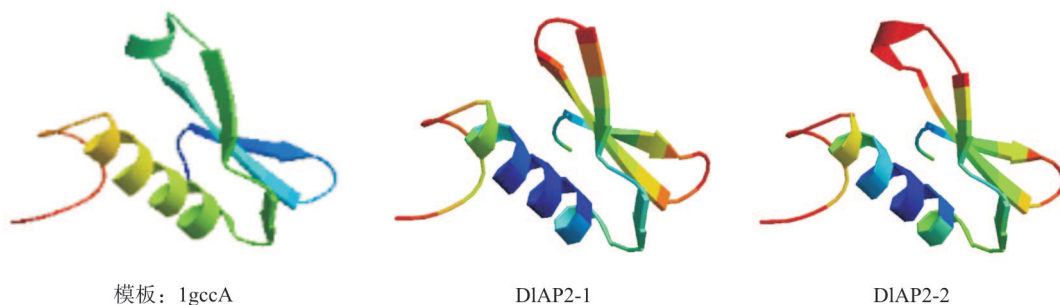


图2 DIAP2 蛋白中 2 个 AP2/ERF 的三级结构预测

Fig. 2 Tertiary structure prediction of two AP2/ERFs in DIAP2

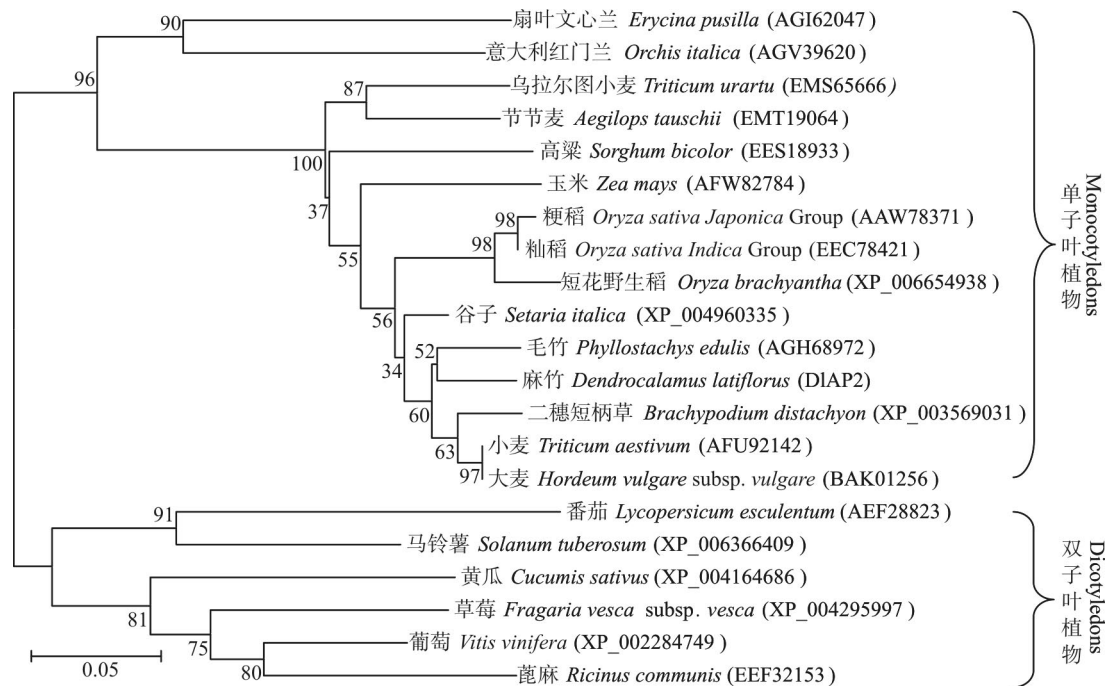


图3 基于 AP2 同源蛋白序列的系统进化树分析。每个分支上的数字表示 1000 次重复搜索的靴带值。

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis based on AP2 homologue proteins. Numbers on major branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicate analyses.



图4 miR172a 对 DIAP2 转录切割的位点鉴定。↓: 切割位置。

Fig. 4 Target sites for miR172a in DIAP2 transcription. ↓: Cleavage sites.

物种 AP2 同源蛋白的系统进化树表明,来自单子叶植物和双子叶植物 AP2 同源蛋白分别聚集成两个大的分支,麻竹则与毛竹聚集在一起,与大麦 (*Hordeum vulgare*)、小麦和二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)的分支靠近,其次是谷子(*Setaria italica*)、玉米、高粱(*Sorghum bicolor*)等单子叶植物,而与双子叶植物的距离较远(图 3)。

### 2.3 miR172a对靶基因的剪切鉴定

采用连接酶介导的 5' RACE (RLM-5' RACE) 来验证 miR172a 对靶基因的剪切。RLM-5' RACE 产物经测序表明, 10 个样品中仅有 1 个样品的剪切位点在第 12~13 个碱基之间,其余 9 个样品的剪切位点都在第 11~12 个碱基之间(图 4),这与拟南芥 miR172a 对其 AP2 的转录切割位置主要在第

11~12 个碱基之间相一致<sup>[12]</sup>,表明 miR172a 能在转录水平对其靶基因 DIAP2 进行调控。

### 2.4 miR172a及DIAP2基因表达检测

采用 qRT-PCR 对 miR172a 和 DIAP2 基因进行定量分析,结果表明(图 5),在 1.0 cm、1.5 cm、2.0 cm 花芽中 miR172a 的表达量呈逐渐上升的趋势,其中 2.0 cm 花芽中的表达丰度最高;而 DIAP2 基因的表达量则呈下降的趋势,其中 2.0 cm 花芽中的表达量最低,说明 miR172a 和 DIAP2 基因的表达量呈现相反的变化规律。在开花株幼枝和未开花植株叶片中 miR172a 和 DIAP2 基因的表达没有明显的差异。开花枝条顶端叶片、开花植株未开花枝条顶端叶片中 miR172a 和 DIAP2 基因的表达丰度较低。

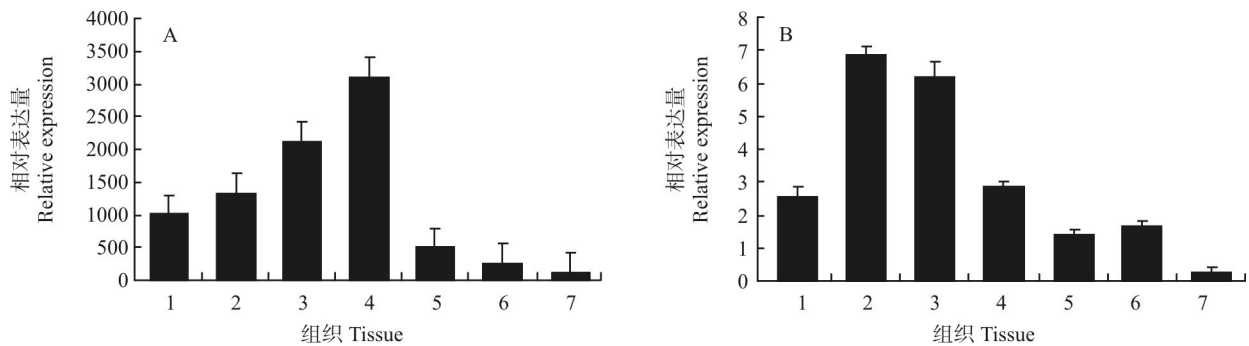


图 5 *miR172a* (A) 和 *DIAP2* (B) 的表达情况。1: 开花株幼枝; 2: 1.0 cm 花芽; 3: 1.5 cm 花芽; 4: 2.0 cm 花芽; 5: 开花枝条顶端叶片; 6: 开花植株未开花枝条顶端叶片; 7: 未开花植株叶片。

Fig. 5 Expression of *miR172a* (A) and *DIAP2* (B) in different tissues. 1: Young branches of flowering plant; 2: 1.0 cm buds; 3: 1.5 cm buds; 4: 2.0 cm buds; 5: Top leaves on flowering branch; 6: Top leaves on unflowering branch of flowering plant; 7: Leaves of unflowering plant.

### 3 讨论

*AP2* 基因编码一类参与植物花发育的重要调控因子, 具有特有的 AP2 结构域, 不同于其他 MADS-box 家族的基因。根据所含 AP2 功能域数量的差异, 将该家族分为 AP2 亚家族、EREBP 亚家族和 RAV1/RAV2 亚家族<sup>[22]</sup>。对拟南芥的大规模测序表明, 在花器官决定基因 *AP2* 中有一个 *miR172* 结合位点<sup>[23]</sup>, 而且 *miR172* 的积累导致转基因植株花器官产生的异常表型和 *apetala2* 突变体非常相似, 证实了 *miR172* 能调控 *AP2* 的表达<sup>[24]</sup>。本研究获得的 *DIAP2* 属于 AP2 亚家族, 在编码框靠近 3' 端有 1 个高度匹配 *miR172a* 的结合位点, *miR172a* 与靶基因 *DIAP2* 在开花麻竹不同组织中的表达初步证实了 *miR172a* 对 *DIAP2* 的转录调控作用, RLM-5' RACE 的研究结果进一步证实了 *miR172a* 对 *DIAP2* 的精确切割。

*miR172a* 在开花麻竹组织中的表达丰度明显高于未开花植株叶片, 这类似于 *miR172* 的过表达能导致西红柿 (*Lycopersicon esculentum*) 开花提前<sup>[25]</sup>。随着麻竹花芽的伸长, *miR172a* 的表达量呈上升趋势, 而 *DIAP2* 基因呈下降趋势, 这可能与花芽发育趋于完成有关, 因为麻竹花芽达到 2.0 cm 时其花器官各部分已经分化完成。在开花幼枝、开花枝条顶端叶片、开花植株未开花枝条顶端叶片中 *miR172a* 和 *DIAP2* 的表达丰度都变化不大, 这可能是它们在营养器官中处于一种平衡状态。类似的现象已在拟南芥中得到证实, 当营养生长向生殖生长转变时, *miR172* 调控 AP2 家族转录因子 *TOE1*、*TOE2*、*SNZ* 和 *SMZ*, 这些 AP2 家族成员中任何一

个组成型表达都使开花延迟<sup>[11]</sup>。

*miR172* 除了自身调控其靶基因外, 还和其它 miRNA 一起行使调控功能。玉米 *AP2* 基因 *sid1* 含有 1 个 *miR172* 结合位点, *miR172* 不但参与幼年期的发育调控<sup>[26]</sup>, 而且在 *miR156* 的间接作用下, 调控玉米花序分生组织的决定<sup>[27]</sup>。另外, 研究表明 *miR172* 通过翻译抑制来调控 *AP2* 的表达, 利用破坏 *miR172* 的碱基配对, 而不影响其中的 *AP2* 的 RNA 水平, 导致 *AP2* 蛋白水平的升高<sup>[13]</sup>。在麻竹中存在许多与其生长发育调控相关的 miRNA, 通过构建麻竹叶片小 RNA 文库, 鉴别出 84 个保守的 miRNA, 同时还鉴别出 81 个新 miRNA<sup>[19]</sup>。对毛竹笋发育不同阶段以及毛竹叶片和根中的 miRNA 表达模式分析发现, miRNA 的表达具有时空、组织表达特异性<sup>[28-29]</sup>。因此, *miR172a* 对麻竹生长发育的调控将是一个复杂的调控网络, 对于与其它 miRNA 以及靶基因的相互调节机制尚有待于系统研究, 才能对其生长发育调控做出科学全面的解析。

### 参考文献

- [1] Tian B, Chen Y Y, Yan Y X, et al. Cloning of a MADS box gene from bamboo and its expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. Chin Sci Bull, 2005, 50(2): 145-151.  
田波, 陈永燕, 严远鑫, 等. 一个竹类植物 MADS 盒基因的克隆及其在拟南芥中的表达 [J]. 科学通报, 2005, 50(2): 145-151.
- [2] Gao Z M, Liu Y L, Li X P, et al. Cloning and sequence analysis of a flowering-related MADS-box gene in *Bambusa oldhamii* [J]. Mol Plant Breed, 2007, 5(6): 866-870.  
高志民, 刘颖丽, 李雪平, 等. 一个绿竹 MADS-box 基因的克隆与序列分析 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 866-870.



- [3] Lin E P. Functions of *API/SQUA*-, *REV*-, *TBI*-like genes and isolation and expression of microRNAs in *Phyllostachys praecox* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009: 37–45.  
林二培. 早竹*API/SQUA*-, *REV*-, *TBI*-like基因的功能研究与竹笋microRNAs的克隆和表达分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009: 37–45.
- [4] Gao Z M, Zheng B, Peng Z H. Isolation of *PeMADS1* gene from *Phyllostachys edulis* and its transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Sci Silv Sin*, 2010, 46(10): 37–41.  
高志民, 郑波, 彭镇华. 毛竹*PeMADS1*基因的克隆及转化拟南芥初步研究 [J]. *林业科学*, 2010, 46(10): 37–41.
- [5] Chen D L, Peng Z H, Gao Z M. Cloning and express analysis of *PeAP2* gene and its promoter in *Phyllostachys edulis* [J]. *For Res*, 2013, 26(2): 200–206.  
陈东亮, 彭镇华, 高志民. 毛竹*PeAP2*基因的克隆及其启动子的克隆与表达初步分析 [J]. *林业科学研究*, 2013, 26(2): 200–206.
- [6] Peng Z H, Lu Y, Li L B, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461.
- [7] Gao J, Zhang Y, Zhang C L, et al. Characterization of the floral transcriptome of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) at different flowering developmental stages by transcriptome sequencing and RNA-seq analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98910.
- [8] Elliott R C, Betzner A S, Huttner E, et al. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 155–168.
- [9] Chuck G, Meeley R B, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene indeterminate spikelet [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(8): 1145–1154.
- [10] Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(8): 1737–1749.
- [11] Jung J H, Seo J H, Reyes J L, et al. The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2736–2748.
- [12] 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): 2730–2741.
- [13] Chen X M. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022–2025.
- [14] Schwab R, Palatnik J F, Riester M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(4): 517–527.
- [15] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chin For Sci Techn*, 2006, 5(3): 52–54.
- [16] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, 157(1): 105–132.
- [17] Deléage G, Blanchet C, Geourjon C. Protein structure prediction. Implications for the biologist [J]. *Biochimie*, 1997, 79(11): 681–686.
- [18] Chen C, Ridzon DA, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [19] Zhao H S, Chen D L, Peng Z H, et al. Identification and characterization of microRNAs in the leaf of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) by deep sequencing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78755.
- [20] Fan C J, Ma J M, Guo Q R, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [22] Lin R M, Zhao W S, Meng X B, et al. Molecular cloning and characterization of a rice gene encoding AP2/EREBP-type transcription factor and its expression in response to infection with blast fungus and abiotic stresses [J]. *Physiol Mol Plant P*, 2007, 70(1/2/3): 60–68.
- [23] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19–53.
- [24] Zhao L, Kim Y J, Dinh T T, et al. *miR172* regulates stem cell fate and defines the inner boundary of *APETALA3* and *PISTILLATA* expression domain in *Arabidopsis* floral meristems [J]. *Plant J*, 2007, 51(5): 840–849.
- [25] Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, et al. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172* [J]. *Development*, 2009, 136(17): 2873–2881.
- [26] Chuck G, Cigan A M, Saetern K, et al. The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(4): 544–549.
- [27] Chuck G, Meeley R, Hake S. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize *AP2* genes *ids1* and *sid1* [J]. *Development*, 2008, 135(18): 3013–3019.
- [28] He C Y, Cui K, Zhang J G, et al. Next-generation sequencing-based mRNA and microRNA expression profiling analysis revealed pathways involved in the rapid growth of developing culms in moso bamboo [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 119. doi:10.1186/1471-2229-13-119
- [29] Xu P, Mohorianu I, Yang L, et al. Small RNA profile in moso bamboo root and leaf obtained by high definition adapters [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103590.