

# 毛竹 miR398 和 miR408 的克隆及其表达分析

李利超<sup>1</sup>, 孙化雨<sup>1</sup>, 杨意宏<sup>2</sup>, 赵韩生<sup>1</sup>, 王思宁<sup>1</sup>, 高志民<sup>1\*</sup>

(1. 国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001)

**摘要:** 为了解毛竹(*Phyllostachys edulis*)中 miR398 和 miR408 的表达情况, 从毛竹叶片中分离了二者的前体序列, 并用实时定量 PCR 技术对其表达模式进行了研究。结果表明, 毛竹中 miR398 和 miR408 前体序列 *ped-MIR398* 和 *ped-MIR408* 长度分别为 83 bp 和 92 bp, 二者均能形成稳定的茎环结构, 其中成熟 miRNA 序列(*ped-miR398* 和 *ped-miR408*)均位于 5'端臂上。*ped-miR398* 和 *ped-miR408* 均为组成型表达, 在毛竹叶中表达量最高。强光、蔗糖和 GA<sub>3</sub> 处理后, 叶片中 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达量均上调; CuSO<sub>4</sub> 和 ABA 处理后, 叶片中二者的表达量均下调; 黑暗、NaCl 和 4℃ 处理后, 前者表达量上调, 后者表达量下调。因此, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 在毛竹适应逆境胁迫过程中可能发挥着不同的调控作用。

**关键词:** 毛竹; miRNA; 非生物胁迫; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.3697

## Cloning and Expression Analysis of miR398 and miR408 in *Phyllostachys edulis*

LI Li-chao, SUN Hua-yu, YANG Yi-hong, ZHAO Han-sheng, WANG Si-ning, GAO Zhi-min<sup>\*</sup>

(1. International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China)

**Abstract:** To investigate the expression patterns of miR398 and miR408 in *Phyllostachys edulis*, the precursor sequences of *ped-MIR398* and *ped-MIR408* were isolated, and the expression of miRNAs was analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR). The results showed that the length of precursor sequences of *ped-MIR398* and *ped-MIR408* were 83 bp and 92 bp, respectively, which both could fold into stable stem-loop structures, and the mature sequences (*ped-miR398* and *ped-miR408*) were generated at 5' end of the arm in the stem-loop structures, respectively. The qPCR results indicated that both *ped-miR398* and *ped-miR408* were constitutively expressed, among which was most abundant in leaf blades. The expression of *ped-miR398* and *ped-miR408* were both up-regulated by the treatments of high light intensity, sucrose and GA<sub>3</sub>, and they were both down-regulated by the treatments of CuSO<sub>4</sub> and ABA. Under the treatments of darkness, NaCl and 4℃, the expression of *ped-miR398* was up-regulated, and that of *ped-miR408* was down-regulated. Therefore, it was suggested that *ped-miR398* and *ped-miR408* might play different regulatory roles in the process of abiotic stress adaptation in bamboo.

**Key words:** *Phyllostachys edulis*; miRNA; Abiotic stress; Gene expression

MicroRNA (miRNA)是由茎环结构的前体 RNA 经过 Dicer-like 核酸内切酶加工后形成的非编码小分子 RNA, 长度一般为 21~30 nt<sup>[1]</sup>。miRNA 最早

发现于线虫<sup>[2]</sup>, 随后在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和玉米(*Zea mays*)等植物中大量发现<sup>[3-6]</sup>。研究表明, 植物

收稿日期: 2016-11-10

接受日期: 2017-01-14

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2015BAD04B01)资助

This work was supported by the National Sci-Technology Plan Projects of the Twelfth Five-year in Rural (Grant No. 2015BAD04B01).

作者简介: 李利超, 男, 硕士研究生, 主要从事竹子生长发育调控研究。E-mail: lilichao1991@126.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

miRNA 通过切割靶基因的方式导致靶基因沉默来参与几乎所有的生物代谢途径,对植物的生长发育以及响应非生物胁迫过程具有重要的调控作用。水稻 miR397 和 miR156 参与愈伤组织从未分化到分化的转化过程,对分生组织的维持和胚胎的发生具有重要调节作用<sup>[7]</sup>。miR408 是营养生长的强大调节剂,其组成型表达能够增强拟南芥幼苗和成年植株的生长<sup>[8]</sup>。拟南芥中 miR397、miR398、miR408 和 miR857 可以通过下调编码含铜蛋白(质体蓝素和铜/锌超氧化物歧化酶)的基因表达,来应对环境铜的变化,以维持植物体内铜的平衡<sup>[9]</sup>。拟南芥中 miR398 还能通过切割两个 Cu/Zn 超氧化物歧化酶基因(*CSD1* 和 *CSD2*)的 mRNA 来实现对其调控,而表达抗 miR398 切割的 *CSD2* 能够比过量表达 *CSD2* 的植株更具有抗强光、重金属以及氧化胁迫的能力<sup>[10]</sup>。过量表达 miR408 能够提高转基因植株的耐盐、抗寒和抗氧化胁迫能力,但其对干旱和渗透胁迫的敏感性也增加<sup>[11]</sup>。人类生存环境的变化,迫使人们不断寻求抗逆、高产、优质的植物资源,挖掘其中具有重要育种价值的基因资源用于现代植物分子聚合育种。

竹类植物资源被认为是一种可持续利用的再生资源,是热带亚热带地区森林资源的重要组成部分,具有重要的生态、经济价值。我国竹类植物资源丰富,种类繁多,但其特殊的生殖特性严重限制了其常规育种的发展。随着现代生物技术的发展,分子育种将为竹子的育种带来新的契机,挖掘具有潜在育种价值的基因资源是开展分子育种的基础,毛竹基因组草图<sup>[12]</sup>和竹子基因组数据库的建立为开展竹子基因资源的挖掘奠定了基础。除了参与竹子生长发育和逆境适应相关的结构基因、调节基因,关于竹子 miRNA 的研究也日趋受到重视。如通过小 RNA 测序在毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶片中发现了 92 个保守 miRNA 和 95 个新的 miRNA,在麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)叶片中发现了已知的成熟 miRNA 69 个和新 miRNA 62 个<sup>[13]</sup>。通过对 *PheDof1*、*PheMADS14* 和 6 个 miRNA (miR159a.1、miR160a、miR168-3p、miR390a、miR393 和 miR5139) 的表达分析,揭示出 miRNA 在毛竹花发育和成花转变中发挥着重要作用<sup>[14]</sup>;对 *phe-miR397* 和 *phe-miR1432* 在光照、干旱、NaCl 和温度胁迫以及 ABA 和 GA<sub>3</sub> 处理后的表达研究表明它们可能参与调控毛竹抵御非生物胁迫,且与内源激素的调节相关

联<sup>[15]</sup>。麻竹 miR172a 通过调控其靶基因 *DIAP2* 来实现对麻竹花芽发育的调控<sup>[16]</sup>。然而,对竹类植物中 miRNA 的研究刚刚开始,尚有更多的 miRNA 需要深入研究。本文以毛竹为材料,从中分离了 miR398 和 miR408 的前体序列,并对其上游启动子序列进行了分析,对多种非生物胁迫下毛竹中 miR398 和 miR408 表达的变化进行了研究,以期为进一步揭示 miR398 和 miR408 在竹子抗逆中的作用提供参考,并为未来培育竹子抗逆新品种提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和处理

毛竹(*Phyllostachys edulis*)种子播种萌发后,盆栽于营养钵内,栽培基质为腐殖质土。培养条件为:25℃,光照强度 150~200 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,光周期光/暗=16 h/8 h,至长出 5 个叶片(约 0.5 年)用于试验。分别取盆栽毛竹实生苗的根、茎、叶片和叶鞘液氮速冻后存-80℃备用。

选取长势一致的毛竹盆栽苗,一部分分别在黑暗、强光(1500 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)和低温(4℃)下处理 3 h;另一部分分别用 1%蔗糖、CuSO<sub>4</sub> (50 μmol L<sup>-1</sup>)<sup>[17]</sup>、NaCl (300 mmol L<sup>-1</sup>)<sup>[18]</sup>、GA<sub>3</sub> (100 μmol L<sup>-1</sup>)和 ABA (100 μmol L<sup>-1</sup>)<sup>[19]</sup>处理 3 h,处理后取叶片样品。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Trizol 法<sup>[20]</sup>分别提取毛竹根、茎、叶片、叶鞘以及胁迫处理后叶片的总 RNA,于 37℃用 RNase-free DNase I (Promega, USA)处理 30 min,以去除基因组 DNA 污染。分别采用 1%琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo 美国)来检测 RNA 的质量和浓度。利用反转录试剂盒 (Promega, USA)提供的通用引物,将毛竹叶片 RNA 合成 cDNA。

根据 BambooGDB 数据库中毛竹 miR398 与 miR408 成熟序列及前体序列(PH01001517/PH01003-062),按照茎环法<sup>[21]</sup>分别设计反转录引物、正向引物和反向通用引物(Universal reversal primer, URP),正向引物 3'端序列与成熟 miRNA 一致,反转录引物与成熟 miRNA 3'端序列的碱基完全互补(表 1)。引物由上海生物工程技术有限公司合成。分别利用反转录引物将符合质量要求的上述 RNA 合成 cDNA,

表1 PCR 所用引物

Table 1 List of PCR primer sequences

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')
398-RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCACCATGT	408-R	GCTCCCCTAGTCCCCTTCGC
408-RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCCGGG	398-F1	ACGGGCGATGGGCGAATG
398-F	TCCTCCATGGTAAGAAAGCTATAAGT	408-F1	ACGGGCGATGGCACAGCACTGTAGA
398-R	GTAATTTCCAGTGGGTGGTCTATATT	URP	CTCAACTGGTGTCTGGAGTC
408-F	ATGACGTAACATATATCTCTTAAACAC		

每个 miRNA 对应的样品进行一次反转录, 重复 3 次。

### 1.3 miRNA 前体序列克隆

采用改良 CTAB 法<sup>[22]</sup>提取毛竹叶片基因组 DNA, 并作为模板, 分别采用引物对 398-F/398-R 和 408-F/408-R 进行 PCR, 扩增毛竹 miR398 与 miR408 的前体序列。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 10  $\times$ Pyrobest PCR Buffer 2  $\mu$ L, dNTP mixed (2.5 mmol L<sup>-1</sup>) 1.6  $\mu$ L, 398-F 或 408-F (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 的 398-R 或 408-R 1  $\mu$ L, DMSO 1.1  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L, 超纯水 12.2  $\mu$ L, Pyrobest 酶 0.2  $\mu$ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 150 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 反应 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 10 $^{\circ}$ C 保温。电泳检测后进行回收、加 A、连接到 pGEMT-easy 载体, 并转化大肠杆菌涂板后挑选阳性克隆, 送检测序。

### 1.4 生物信息学分析

利用在线软件 RNAfold WebSever (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)进行 miRNA 前体二级结构的预测, 利用 WebLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)对 miRNA 成熟序列的碱基保守性进行分析。利用公共数据库 miRBase21 (<http://www.mirbase.org/>)和毛竹数据库 (<http://www.bamboogdb.org/>)下载玉米、水稻、高粱 (*Sorghum bicolor*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、大豆 (*Glycine max*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、毛竹等植物的 miR398 和 miR408 成熟序列及前体序列, 用 MEGA 6.0 软件构建基于 miRNA 前体的系统进化树。下载 miR398 和 miR408 前体上游 1500 bp 的启动子序列, 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对其启动子中的作用元件进行分析。

### 1.5 表达模式分析

以颈环反转录引物合成的 miRNA 特异性

cDNA 为模板, 分别用 398-F1 和 408-F1 与通用引物(URP)配对使用, 对毛竹根、茎、叶片、叶鞘以及不同胁迫处理后毛竹叶片样品中 miR398 和 miR408 的表达量进行实时定量 PCR (qRT-PCR)分析, 同时以 *U6* 为内参基因<sup>[23]</sup>。qRT-PCR 选用 Roche 公司 LightCycle 480 SYBR Green I Master 试剂盒, 在 qTOWER2.2 PCR 仪(Jena, Germany)上进行, 反应体系(10  $\mu$ L): Mix 5  $\mu$ L, cDNA 0.4  $\mu$ L, 398-F1 或 408-F1 0.2  $\mu$ L, URP 0.2  $\mu$ L, 超纯水 4.2  $\mu$ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 45 个循环。每个样品每次反应重复 3 次, 以 3 次生物学重复的试验结果用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法进行分析<sup>[24]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 miRNA 前体序列分析及结构预测

以毛竹基因组 DNA 为模板, 采用引物对 398-F/398-R 和 408-F/408-R 进行 PCR 扩增, 产物经电泳检测, 结果表明二者在 450 bp 左右均有一特异条带(图略), 测序表明序列长度分别为 438 bp 和 447 bp, 与预测的包含毛竹前体 *ped-MIR398* 和 *ped-MIR408* 的序列大小一致, *ped-MIR398* 与 *ped-MIR408* 分别为 83 bp 和 92 bp。

以毛竹 cDNA 为模板, 分别用特异引物 398-F1/UPR 和 408-F1/UPR 对成熟序列进行扩增, 扩增产物经电泳检测, 在 70 bp 左右有一特异条带(图略), 测序表明二者长度均为 69 bp, 去除通用引物序列后, 分别包含各自成熟 miRNA *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的对应序列 5'-GGGGCGAATTGAGAACA-CATGGTG-3' 和 5'-GGCACAGCACTGTAGACCC-GGCC-3', 均为 24 bp。

下载 miRbase (<http://mirbase.org/index.shtml>)中现有的 miRNA 前体序列, 用 MEGA6.0 构建基于 miR398 与 miR408 前体序列的进化树。结果表明, 来自双子叶植物和单子叶植物的 miR408 家族的成

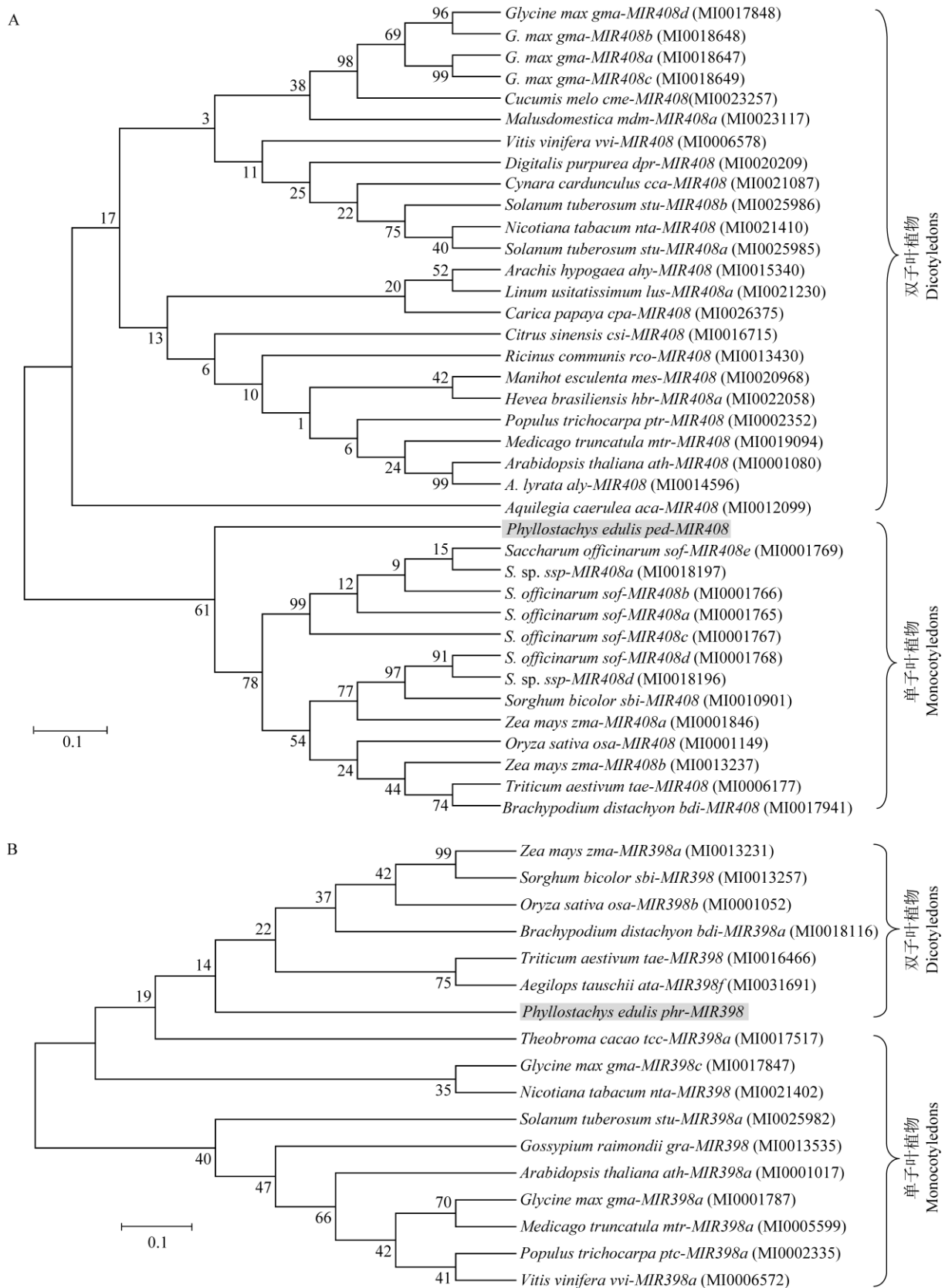


图 1 基于前体序列构建的系统进化树(A: MIR408; B: MIR398)。每个分子上的数字表示 1000 次重复搜索的靴带值。

Fig. 1 Phylogenetic tree based on sequences of precursors (A: MIR408; B: MIR398). Numbers on major branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicate analysis.

员分别聚成两大分支, 其中 *ped-MIR408* 虽然与其他单子叶成员聚类到一起, 但并没有与其它成员聚类到相同的分枝, 这意味着 *ped-MIR408* 的进化可能更为原始(图 1: A)。miR398 家族的成员虽然也聚类成两个大的分支, 但并非是单子叶植物和双子叶植物分枝, 其中来自双子叶植物烟草、大豆和可可树(*Theobroma cacao*)的 miR398 前体却与其它单子叶植物的成员聚类到一起(图 1: B), 这表明依据植物 miRNA 前体序列构建的进化树并非与现有的形态学分类完全一致。

利用 RNAfold WebSever 预测前体序列的二级结构, 结果表明 *ped-MIR398* 与 *ped-MIR408* 均能形成稳定的茎环结构, 且在茎环结构 5'端的臂上分别为其成熟序列 *ped-miR398* (5'-GGGGCGAAUUG-AGAACAUGGUG-3')(图 2: A)和 *ped-miR408* (5'-GGCACAGCACUGUAGACCCGGCCC-3')(图 2: B), 它们与来自其它单子叶植物的 miR398 与 miR408 前体序列有着相似的结构, 表明 *ped-MIR398* 与 *ped-MIR408* 在毛竹中是真实存在的。

## 2.2 miRNA 成熟序列保守性分析及其前体启动子序列顺式作用元件预测

对已知 miR398 与 miR408 成熟序列的碱基保

守性进行分析, 结果表明, miR398 家族成员的成熟序列的碱基保守性整体都较高, 尤其是第 2、4、9、11、16、18 和 21 位的碱基保守性均较强(图 3: A), *ped-miR398* 成熟序列的碱基保守性与其它成员一致。而 miR408 家族成熟序列的碱基保守性差异较大, 仅在第 1、3、7、8、12、17 和 20 位上的碱基保守性较强(图 3: B), 表明 miR408 在进化过程中比较活跃, 在功能上 *ped-miR408* 可能与其它家族成员存在一定的差异, 有待于进一步试验证实。

虽然 miRNA 具有众多的调控功能, 但其表达也受到启动子的调控。利用 PlantCARE 对毛竹 *ped-MIR398* 与 *ped-MIR408* 前体上游启动子序列进行预测, 表明其中除了包含 TATA-box 和 CAAT-box 等启动子基本元件外, 还含有多种顺式作用元件和应答元件(表 2), 响应的环境因子涉及光、温度和激素等, 由此推测 *ped-MIR398* 和 *ped-MIR408* 的表达可能会受到这些环境因子胁迫的诱导或抑制。

## 2.3 miRNA 表达模式分析

为揭示 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的组织表达模式, 采用实时定量 PCR 的方法对其在毛竹的根、茎、叶片和叶鞘中的表达进行了分析。结果表明, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 在各组织中均有表达, 为组成型表达模式, 且均在叶中表达丰度最高, 根中次之, 茎和叶鞘中表达量较少(图 4)。

为探讨外界因子对 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 表达的影响, 对不同处理的毛竹叶片中 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达进行了定量分析。结果表明, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 受强光和黑暗处理的反应并不一致, 其中 *ped-miR398* 的相对表达量均上调, 且黑暗处理对其影响更大, 处理 3 h 后其表达量约为对照的 1.9 倍; 而 *ped-miR408* 经黑暗处理后表达受到抑制, 处理 3 h 后的表达量仅为对照的 44%, 强光诱导 3 h 后的表达量约为对照的 1.6 倍(图 5: A)。蔗糖处理后, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达均呈现不同程度的上调, 分别约为对照的 1.9 倍和 1.2 倍; NaCl 处理后, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达呈现相反的趋势, *ped-miR398* 的表达显著上调, 处理 3 h 后约为对照的 23.7 倍, *ped-miR408* 的表达下调, 处理 3 h 后仅为对照的 30% (图 5: B)。低温(4℃)处理后, *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达也呈现相反的趋势, 处理 3 h 后 *ped-miR398* 的表达上调, 为对照的 2.9 倍, 而 *ped-miR408* 的表达则



图 2 *ped-MIR398*(A)和 *ped-MIR408*(B)前体的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of *ped-MIR398* (A) and *ped-MIR408* (B)

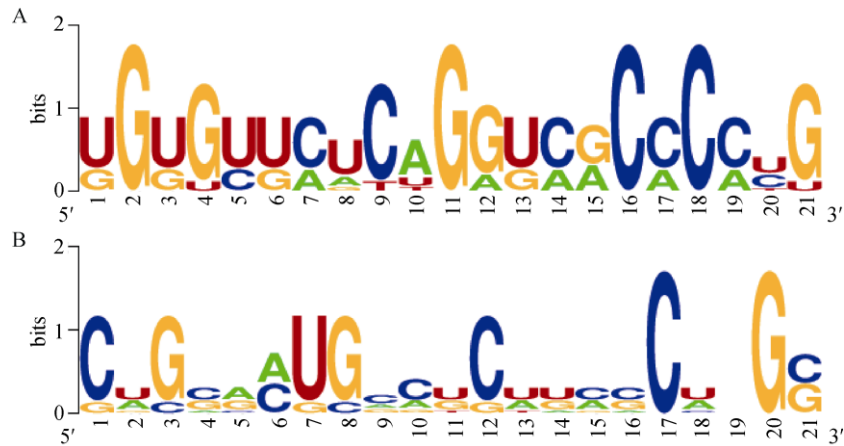


图 3 miR398(A)和 miR408(B)成熟序列碱基保守性分析

Fig. 3 Conservative analysis of nucleotides in miR398 (A) and miR408 (B)

表 2 *ped-MIR398* 和 *ped-MIR398* 上游启动子序列中顺势作用元件

Table 2 Cis-elements in the promoter sequences upstream *ped-MIR398* and *ped-MIR398*

启动子 Promoter	顺式作用元件 Cis-acting elements	应答环境因子 Environmental factors
<i>ped-MIR398</i>	3-AF1 binding site、ATC-motif、ATCT-motif、Box 4 等 ABRE、AuxRR-core、TCA-element LTR MBS	光 Light 激素 Hormone 温度 Temperature 干旱 Drought
<i>ped-MIR408</i>	3-AF1 binding site、ACE、Box 4、GA-motif、Sp1 ABRE、CGTCA-motif、TCA-element、TGA-box HSE	光 Light 激素 Hormone 温度 Temperature

下调，为对照的一半(图 5: C)。CuSO<sub>4</sub> 处理后，受高浓度的 Cu<sup>2+</sup>胁迫 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达均受到抑制，处理 3 h 后分别为对照的 13% 和 1% (图 5: C)。GA<sub>3</sub> 和 ABA 处理后，*ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达趋势相似，GA<sub>3</sub> 处理 3 h 后 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达上调，分别为对照的 1.07 倍和 1.18 倍，ABA 处理 3 h 后分别下调为对照的 60% 和 50% (图 5: D)。

### 3 讨论

非编码 RNA 在基因表达调控中的作用越来越受到人们的关注<sup>[25-26]</sup>，其中 miRNA 是近年来研究的热点之一。miRNAs 作为一类新的具有调控基因表达能力的非编码 RNA，在调控植物的生长发育、适应各种逆境胁迫过程中均发挥着重要作用。

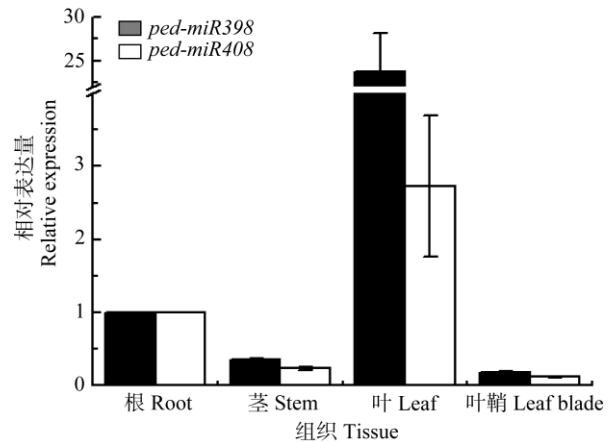
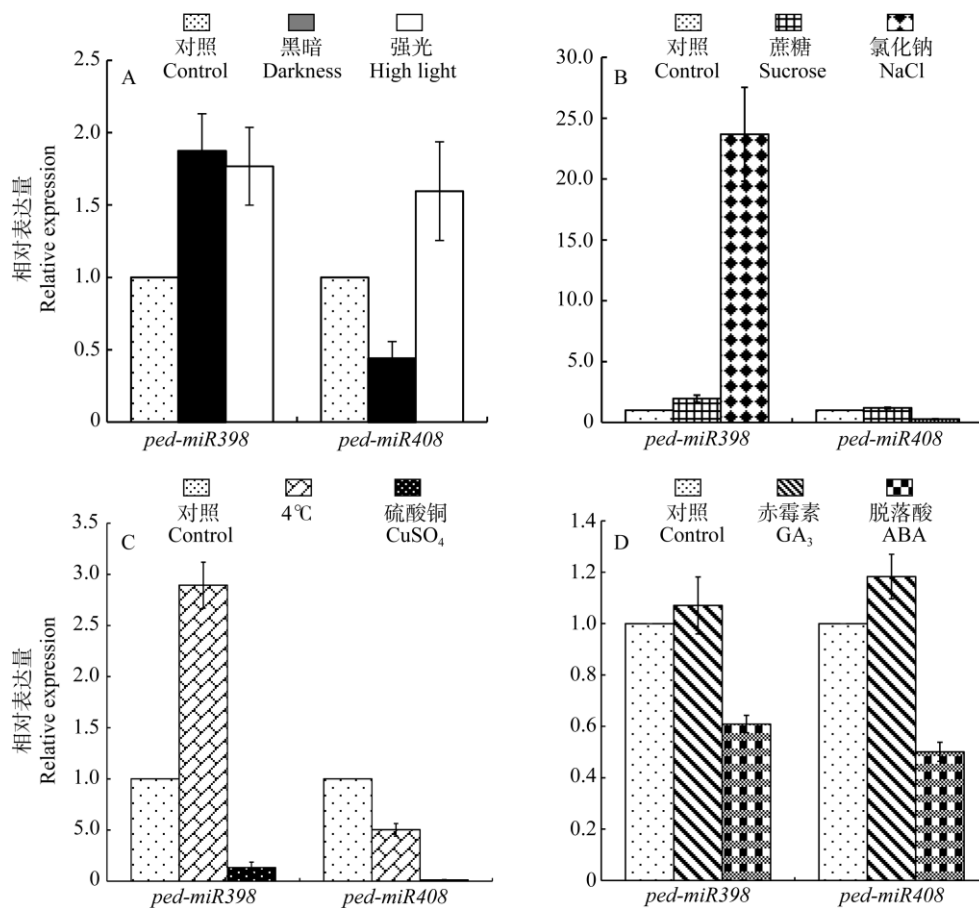


图 4 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 在不同组织中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *ped-miR398* and *ped-miR408* in different tissues

*miR398* 是首个被发现与受逆境胁迫调控相关的 miRNA，在受到干旱、高盐 and ABA 等胁迫时能做出应答<sup>[27]</sup>。*miR408* 首次发现于拟南芥中，虽对 *miR408* 的研究较少，但也有研究表明其在抗盐、抗冻等非生物胁迫方面也发挥着重要作用<sup>[28]</sup>。miRNA 在不同植物物种间存在保守性<sup>[29]</sup>，这也意味着不同物种间的 miRNA 可能发挥着相似的作用。对本研究克隆的毛竹 miRNA 分析表明，其前体序列 *ped-MIR408* 比较保守，而 *ped-MIR398* 则在进化上更具多样性，但其各自的成熟 miRNA 则都比较保守，且 *miR398* 家族成员的碱基保守性整体高于 *miR408* 家族，表明同一家族 miRNA 功能的相似性，但具体 *ped-miR398* 和 *ped-miR408* 的调控功能需要进一步研究。

图5 不同处理条件下 *ped-miR398* 与 *ped-miR408* 的表达分析Fig. 5 Expression of *ped-miR398* and *ped-miR408* under different treatments

miRNAs 虽然具有调控功能,但其自身的表达同样受到外界因子的影响。通过对毛竹 *ped-MIR398* 和 *ped-MIR408* 上游启动子区域的分析表明,有多种与逆境、激素相关的顺式作用元件,这意味着它们可能参与逆境胁迫以及激素的应答调控。*ped-miR398* 和 *ped-miR408* 在强光、黑暗、蔗糖、NaCl、低温(4°C)、CuSO<sub>4</sub>、GA<sub>3</sub> 和 ABA 等处理下的表达变化进一步证实了这一点。然而,不同胁迫、不同激素对 miRNA 表达的影响存在着一定的差异。如黑暗和强光均诱导 *ped-miR398* 的表达,而 *ped-miR408* 的表达则受到黑暗的抑制、强光的诱导;*ped-miR398* 和 *ped-miR408* 在蔗糖胁迫下表达量均上调,在铜胁迫下则均下调;低温胁迫下 *ped-miR398* 表达量上调而 *ped-miR408* 表达量下调;GA<sub>3</sub> 诱导 *ped-miR398* 和 *ped-miR408* 的表达,而 ABA 则抑制其表达。由此表明,miRNAs 参与逆境胁迫和激素应答的机制可能十分复杂<sup>[18]</sup>。

miRNA 的调控功能是通过调控基因的表达来

实现的,包括转录调控、mRNA 降解和翻译抑制等方式,其中 miRNA 与其靶位点 mRNA 互补结合,引起靶 mRNA 的降解是植物中比较常见的方式,如毛竹 *ped-miR164b* 通过降解其靶基因 *PeSNAC1* 来参与器官边缘的发育和抗逆调控<sup>[30]</sup>。另外,miRNA 的表达与功能受到转录因子、单核苷酸多态性、RNA 编辑、甲基化以及生物钟等多种植物自身因素的调节<sup>[31]</sup>。因此,miRNAs 的表达与调控是一个复杂的调控网络,1 个 miRNA 既可以调控单个基因的表达,也可以调控多个基因的表达,某个基因的表达可以受到多个 miRNA 组合的精细调控。然而,对竹子 miRNA 的研究刚刚起步,我们推测有多家族的 miRNA 参与了竹子生长发育调控<sup>[32]</sup>,尚有众多 miRNA 的功能需要深入挖掘,且一些新的 miRNA 需要去发现。本研究对毛竹 *ped-miR398* 和 *ped-miR408* 的表达分析,为进一步开展二者及其对应靶基因之间的调控关系研究提供了初步参考,为揭示其在竹子生长发育过程中的调控机制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] de LIMA J C, LOSS-MORAIS G, MARGIS R. MicroRNAs play critical roles during plant development and in response to abiotic stresses [J]. *Genet Mol Biol*, 2012, 35(4): 1069–1077. doi: 10.1590/S1415-47572012000600023.
- [2] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- [3] SUNKAR R, GIRKE T, JAIN P K, et al. Cloning and characterization of microRNAs from rice [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1397–1411. doi: 10.1105/tpc.105.031682.
- [4] SUNKAR R, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019. doi: 10.1105/tpc.104.022830.
- [5] YAO Y Y, GUO G G, NI Z F, et al. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(6): R96. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r96.
- [6] MICA E, GIANFRANCESCHI L, PÈ M E. Characterization of five microRNA families in maize [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2601–2612. doi: 10.1093/jxb/erl013.
- [7] LUO Y C, ZHOU H, LI Y, et al. Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(21): 5111–5116. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.046.
- [8] ZHANG H Y, LI L. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2013, 74(1): 98–109. doi: 10.1111/tpj.12107.
- [9] ABDEL-GHANY S E, PILON M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15932–15945. doi: 10.1074/jbc.M801406200.
- [10] SUNKAR R, KAPOOR A, ZHU J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051–2065. doi: 10.1105/tpc.106.041673.
- [11] MA C, BURD S, LERS A. *miR408* is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2015, 84(1): 169–187. doi: 10.1111/tpj.12999.
- [12] 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. doi: 10.1038/ng.2569.
- [13] ZHAO H S, WANG L L, DONG L L, et al. Discovery and comparative profiling of microRNAs in representative monopodial bamboo (*Phyllostachys edulis*) and sympodial bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102375. doi: 10.1371/journal.pone.0102375.
- [14] GE W, ZHANG Y, CHENG Z C, et al. Main regulatory pathways, key genes and microRNAs involved in flower formation and development of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. *Plant Biotechnol J*, [2016–7–16]. doi: 10.1111/pbi.12593.
- [15] WANG L L, ZHAO H S, SUN H Y, et al. Cloning and expression analysis of miR397 and miR1432 in *Phyllostachys edulis* under stresses [J]. *Sci Silv Sin*, 2015, 51(6): 63–70. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150608. 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 等. 毛竹 miR397 和 miR1432 的克隆及其逆境胁迫响应表达分析 [J]. *林业科学*, 2015, 51(6): 63–70. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150608.
- [16] GAO Z M, LOU Y F, WANG L L, et al. Cloning and expression analysis of miR172a targeted gene *DIAP2* in *Dendrocalamus latiflorus* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2015, 23(3): 245–251. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.003. 高志民, 娄永峰, 王丽丽, 等. 麻竹 miR172a 靶基因 *DIAP2* 的克隆及其表达 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2015, 23(3): 245–251. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.003.
- [17] DUGAS D V, BARTEL B. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(4): 403–417. doi: 10.1007/s11103-008-9329-1.
- [18] JIA X Y, WANG W X, REN L G, et al. Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(1/2): 51–59. doi: 10.1007/s11103-009-9508-8.
- [19] KAYAL E W, NAVARRO M, MARQUE G, et al. Expression profile of *CBF-like* transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(10): 2455–2469. doi: 10.1093/jxb/erl019.
- [20] GAO Z M, LI X P, LI L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chin For Sci Technol*, 2006, 5(3): 52–54.
- [21] CHEN C F, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(20): e179. doi: 10.1093/nar/gni178.
- [22] GAO Z M, FAN S H, GAO J, et al. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, 19(6): 725–728. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2006.06.009. 高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6): 725–728. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2006.06.009.
- [23] DING Y F, CHEN Z, ZHU C. Microarray-based analysis of cadmium-



- responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3563–3573. doi: 10.1093/jxb/err046.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [25] CARRINGTON J C, AMBROS V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338. doi: 10.1126/science.1085242.
- [26] HAKE S. MicroRNAs: A role in plant development [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(21): R851–R852. doi: 10.1016/j.cub.2003.10.021.
- [27] ZHU C, DING Y F, LIU H L. MiR398 and plant stress responses [J]. *Physiol Plant*, 2011, 143(1): 1–9. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01477.x.
- [28] ZHANG H Y, HE H, WANG X C, et al. Genome-wide mapping of the *HY5*-mediated genenetworks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation [J]. *Plant J*, 2011, 65(3): 346–358. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04426.x.
- [29] FLOYD S K, BOWMAN J L. Gene regulation: Ancient microRNA target sequences in plants [J]. *Nature*, 2004, 428(6982): 485–486. doi: 10.1038/428485a.
- [30] WANG L L, ZHAO H S, SUN H Y, et al. Expression analysis of miR164b and its target gene *PeNAC1* in *Phyllostachys edulis* under stress [J]. *For Res*, 2015, 28(5): 605–611. doi: 10.3969/j.issn.1001-1498.2015.05.001.
- 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 等. 胁迫条件下毛竹 miR164b 及其靶基因 *PeNAC1* 表达研究 [J]. *林业科学研究*, 2015, 28(5): 605–611. doi: 10.3969/j.issn.1001-1498.2015.05.001.
- [31] CAI Y M, YU X M, HU S N, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2009, 7(4): 147–154. doi: 10.1016/S1672-0229(08)60044-3.
- [32] 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): 0078755. doi: 10.1371/journal.pone.0078755.