

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202305065

刘芳, 郝小花, 陈中元, 等, 2024. Pre-miR172 及 miR172 调控油菜 AP2 基因表达的规律分析 [J]. 广西植物, 44(5): 936–950.

LIU F, HAO XH, CHEN ZY, et al., 2024. Analysis of expression regulation of AP2 gene by pre-miR172 and miR172 in rape [J]. Guihaia, 44(5): 936–950.



Pre-miR172 及 miR172 调控油菜 AP2 基因表达的规律分析

刘芳^{1,2}, 郝小花¹, 陈中元^{1,3}, 何昊^{1,2*}

(1. 湖南文理学院 生命与环境科学学院, 湖南 常德 415000; 2. 常德市农业生物大分子研究中心, 湖南 常德 415000; 3. 水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室, 湖南 常德 415000)

摘要: 为探究油菜 miR172 前体 (pre-miR172) 及成熟体 (miR172) 对 AP2 基因的调控功能, 该研究通过生物信息学方法对 miR172 和 AP2 启动子进行调控元件预测, 分析 6 条油菜 AP2 基因的进化关系及 miR172 与 AP2 的靶向关系; 通过 qRT-PCR 方法检测 AP2、miR172 和 pre-miR172 在早熟和晚熟油菜不同组织的表达规律; 比较分析 miR172 丰度和 AP2 表达量间的相关关系, 以及比较分析 pre-miR172 和 miR172 在表达水平上的相关关系; 通过过表达 pre-miR172, 再次验证 pre-miR172 对成熟体 miR172 及 AP2 的作用。结果表明: (1) miR172 和 AP2 启动子区均存在调控花发育的顺式元件。(2) 6 条 AP2 序列均经历了强烈的纯化选择, 均具备 miR172 的结合位点, 属 miR172 的靶基因。(3) miR172 家族成员均可促进早熟油菜 AP2 表达, 但 miR172d 作用不明显。在晚熟油菜中, miR172a 和 miR172c 作用微弱, miR172b 和 miR172d 二者共同发挥作用降低 AP2 的表达水平。(4) pre-miR172 家族对于早熟油菜中 miR172 家族的表达水平均有促进作用; 在晚熟油菜中 pre-miR172a 和 pre-miR172b 对其成熟序列的形成发挥正调控作用, pre-miR172c 和 pre-miR172d 则对于其成熟序列的形成发挥负调控作用。过表达 pre-miR172 后, miR172 和 AP2 表达规律与上述结果保持一致, 证实 pre-miR172 对 miR172 及 AP2 的调控功能。该研究结果丰富了油菜 AP2 基因的功能调控路径, 为基因的调控功能研究提供了新的思路。

关键词: 油菜, AP2, miR172, pre-miR172, 表达规律

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2024)05-0936-15

Analysis of expression regulation of AP2 gene by pre-miR172 and miR172 in rape

LIU Fang^{1,2}, HAO Xiaohua¹, CHEN Zhongyuan^{1,3}, HE Hao^{1,2*}

(1. College of Life and Environmental Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China; 2. Changde Research Centre Agricultural Biological Macromolecule, Changde 415000, Hunan, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases, Changde 415000, Hunan, China)

收稿日期: 2023-09-12 接受日期: 2023-11-30

基金项目: 国家自然科学基金(32071930); 湖南省自然科学基金(2022JJ40288); 湖南文理学院博士科研启动项目(19BSQD22)。

第一作者: 刘芳(1988—), 博士, 讲师, 研究方向为油菜分子育种, (E-mail) g5n2a5f@163.com。

*通信作者: 何昊, 博士, 讲师, 研究方向为果树栽培, (E-mail) 271285785@qq.com。

Abstract: The appropriate flowering time is of great significance for crop yield. In the cropping pattern of “rice-rice-oil” in southern region, researching on the flowering period of *Brassica napus* can provide a theoretical basis for the breeding of early maturing rape varieties. The AP2 family transcription factors in rape are widely involved in the growth and development and play an important role during flower development. However, there are few studies exploring the regulation of AP2 at the microRNA level. In order to investigate the regulatory functions of the miR172 precursor (pre-miR172) and mature body (miR172) on AP2 gene in rape, the regulatory elements of miR172 and AP2 promoters were predicted based on bioinformatics, then the evolutionary relationship of six rape AP2 genes and the targeting relationship between miR172 and AP2 were analyzed, and the expression patterns of AP2, miR172 and pre-miR172 in different tissues of early and late maturing rape were detected by qRT-PCR. Finally, the correlation between miR172 abundance and AP2 expression level was studied, as well as the correlation between pre-miR172 and miR172. The results were as follows: (1) Both miR172 and AP2 promoter regions had cis-elements that regulated flower development. (2) The six AP2 sequences holded the strong purification selection, and they were the target genes of miR172 based on their binding sites for miR172. (3) miR172 family could promote the flowering of early maturing rape by increasing AP2 expression levels, except for miR172d. In late maturing rape, miR172a and miR172c performed weakly in flowering, while miR172b and miR172d worked together to reduce the expression level of AP2 to inhibit flowering. (4) The pre-miR172 family had a promoting effect on the expression level of miR172 family in early maturing rape; in late maturing rape, pre-miR172a and pre-miR172b exerted positive regulation on the formation of their mature bodies, while pre-miR172c and pre-miR172d exerted the opposite effects. After overexpression of pre-miR172, the expression patterns of miR172 and AP2 remained consistent with the above results, confirming the regulatory function of pre-miR172 on miR172 and AP2. The results of this study enrich the functional regulation pathway of rape AP2 gene, and provide new ideas for the study of gene regulatory function.

Key words: rape, AP2, miR172, pre-miR172, expression pattern

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性非编码小 RNA,一般长度为 18~36 个核苷酸,参与基因转录水平的调控(张幸媛等, 2021)。有研究表明, miRNA 可以通过调控靶基因来调节植物生长发育(Huijser & Schmid, 2011)、开花时间(Spanudakis & Jackson, 2014)和逆境胁迫(Liu & Axtell, 2015)。miRNA 的形成先经过 RNA 聚合酶转录产生初级 miRNA 前体(primary miRNA precursor, pri-miRNA),再经 DCL1 切割后保留 70~500 个核苷酸序列形成茎环二级结构,即 miRNA 前体(miRNA precursor, pre-miRNA),最后 pre-miRNA 通过相似剪切后形成成熟 miRNA(Phillips et al., 2007)。可见 pre-miRNA 对于成熟体 miRNA 的形成具有重要意义。

miR172 广泛存在于植物中,最早在拟南芥中被克隆出来,其对植物的生长发育起基础作用(Park et al., 2002),在植物的生殖转换、花发育、响应胁迫机制等方面具有重要作用(王幼宁等, 2016; 赵晓晖等, 2017)。拟南芥中 miR172 过表达抑制 AP2 蛋白水平,同时抑制成花因子 TOE1 和 TOE2,导致拟南芥提前开花(Aukerman & Sakai, 2003)。在水稻中光敏色素可降低 miR172d 的表达,从而抑制 AP2 家

族中 *OsIDS1* 基因和 *SNB* 基因的表达,诱导开花(Lee et al., 2014)。Li 等(2019)在大岩桐中发现 miR172 过表达导致 *SsAP2-like* 基因表达量下降,促使其提前开花。此外,miR172 通过靶向 AP2 类基因可以调控花器官形态的建成,如藏红花(Tsaftaris et al., 2012)、芥菜(Shivaraj & Singh, 2016)、玉米(Chuck et al., 2007)、水稻(Hu et al., 2009)、月季(François et al., 2018)、苧麻(马鑫, 2017)等,可见 miR172-AP2 在花器官发育中发挥着重要作用(Ji et al., 2011)。

AP2 亚家族是 AP2/ERF 转录因子家族成员之一,包含 2 个重复的 AP2 保守结构域,主要参与植物的生长发育过程(Trupiano et al., 2013; Zhao et al., 2015; Neogy et al., 2019)。最早,AP2 结构域在拟南芥中发现,其与花发育相关(Jofuku et al., 1994),此后,陆续在水稻(Nakano et al., 2006)、油菜(Ghorbani et al., 2020)、苹果(Cheng et al., 2020)、葡萄(Licausi et al., 2010)等多个物种中发现,其参与花发育过程,但功能不尽相同。AP2 的功能发挥会受到 miRNA 的调控,其调控开花时间的机制往往有 miR172 的参与来实现。

油菜 miRNA 的研究起步较晚, Shen 等(2015) 利用油菜基因组, 鉴定到 645 个 MIR 基因, 大部分 miRNA 具有高度保守性, 调控油菜生长发育的各个方面, 包括参与杂种优势调控、种子发育、植物病原互作、非生物胁迫和花发育等方面(陈丽等, 2018)。Wang 等(2019) 分析早、晚花油菜中 miR172 或 AP2 类转录因子的表达模式和功能特性, 发现它们对花器官发育具有调节作用, 其中 *BnaAP2-1*、*BnaAP2-5* 和 *BnaTOE1-2* 可能起到抑制花开的作用。Shivaraj 和 Singh(2016) 分析白菜型油菜和芥菜中 AP2 的表达水平, 揭示其参与芸薹属植物花的发育; 对 miR172 和靶基因 AP2 突变体间杂交能进行分析, 发现二者存在复杂的互作模式。突变 miR172 获得的转基因系均显示出加速开花现象(Shivaraj et al., 2018)。目前, 关于油菜中 miRNA 的研究大多集中在 miRNA 的挖掘与预测, 而涉及 miRNA 与靶基因的调控关系, 以及 pre-miRNA 对于 miRNA 调控的报道较少。

本文以油菜开花基因 AP2 的调控为研究区域, 依托白菜和甘蓝中已发现的 AP2 基因为切入点, 进行比对并获得油菜的 AP2 基因, 采用生物信息学方法、qRT-PCR 方法、相关性分析及过表达载体侵染油菜子叶的方法, 通过对 AP2 进行蛋白理化性质、系统进化关系、选择压力、基序预测和顺式调控元件分析; 对 miR172、pre-miR172 和 AP2 表达规律及 miR172 和 AP2 之间及 pre-miR172 与 miR172 之间的相关性进行分析; 对过表达 pre-miR172 质粒侵染油菜子叶后 miR172 和 AP2 表达水平进行分析, 拟探讨以下问题: (1) 预测 miR172 和 AP2 与花发育的关系; (2) miR172 对 AP2 的调控功能; (3) pre-miR172 对 miR172 的调控功能。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

早熟油菜品种为湘油 420, 晚熟油菜品种为湘油 15, 均由湖南农业大学肖钢教授提供。将油菜种子种于大田, 待其长至 5~7 叶期, 选择长势一致且完整的植株, 取根和叶, 液氮速冻保存于 -80 °C 冰箱中备用, 待油菜生长至花期, 取完整的花, 液氮速冻保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 油菜中 AP2 基因的鉴定

从 TAIR(<http://www.arabidopsis.org>) 和 BRAD

(<http://brassicadb.cn>) 下载白菜、甘蓝的 AP2 基因和蛋白序列, 经过 NCBI 比对, 选择 E-value $\leq 10^{-10}$ 的序列作为目标油菜序列。为进一步明确候选油菜 AP2 家族成员, 从 miRBase(<http://www.mirbase.org/>) 下载油菜 miR172 成熟序列(miR172) 和前体序列(pre-miR172), 将 miR172 成熟序列与已获得的油菜 AP2 序列通过 TAPIR(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/tapir/>) 网站进行预测, 保留具有靶向关系的 AP2 序列; 同时, 基于 miRNA 和靶基因间高度同源, 利用 DNAMAN 比对 miR172 与油菜 AP2 基因, 保留碱基错配数小于 3 的 AP2 序列作为本研究的候选基因。

1.3 miR172 家族和 AP2 基因启动子分析

分别截取 pre-miR172 和 AP2 基因上游 2 000 bp 作为启动子区, 通过 New PLACE(<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 网站进行顺式调控元件预测, 初步预测 miR172 对于油菜开花的作用。

1.4 AP2 系统发育分析

1.4.1 油菜 AP2 蛋白性质分析 利用在线软件 ExPasy(<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测分析候选油菜 AP2 蛋白分子量、等电点(PI), 通过 Cell-PLoc 网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 进行亚细胞定位预测分析。

1.4.2 系统进化和选择压力分析 利用 MEGA11 软件的邻接法进行 AP2、miR172 和 pre-miR172 核苷酸序列的进化树分析, 检验方法为步长检验(bootstrap), 抽样次数 1 000(1 000 replications)。利用 DnaSp V6 软件分析 AP2 基因的非同义突变率(non-synonymous, k_a) 和同义突变率(synonymous, k_s), 计算非同义突变率和同义突变率比值(k_a/k_s), $k_a/k_s < 1$, 认为有纯化选择作用, $k_a/k_s > 1$, 认为有正选择效应, $k_a/k_s = 1$, 认为存在中性选择。

1.4.3 油菜 AP2 基因基序分析 通过 WebLogo(<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 绘制油菜 AP2 蛋白序列结构域的序列标志图。通过 MEME(<http://meme.suite.org/>) 鉴定油菜 AP2 蛋白内部的保守基序。

1.5 qRT-PCR 检测 AP2、miR172 及 pre-miR172 表达规律

采用 miRcute 多糖多酚植物 miRNA 提取分离试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取油菜根、叶和花的 miRNA。使用 miRcute 增强型

miRNA cDNA 第一链合成试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]合成 cDNA,以此 cDNA 为模板,选择 *U6* 作为内参基因,采用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行 qRT-PCR 检测。miR172 家族成员的检测引物见表 1,具体反应体系按照 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书进行,每个样本 3 次重复,在 CFX96 (BIO-RAD) 定量 PCR 仪上进行扩增,运行程序为 95 °C 15 min;94 °C 20 s,60 °C 34 s,40 个循环;溶解曲线分析为 65 °C 5 s,95 °C 0.5 s。

采用 RNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司)提取油菜根、叶和花的总 RNA,并合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,以 *Actin* 为内参基因,采用 TaKaRa 公司[宝生物工程(大连)有限公司]TB Green Premix Ex Taq 试剂盒进行 qRT-PCR 实验,检测 *AP2* 基因和 pre-miR172 表达情况,具体所用引物见表 1。参照说明书按照 25 μ L 体系进行配液,每个样本 3 次重复,在 CFX96 (BIO-RAD) 定量 PCR 仪上进行扩增,程序为 95 °C 30 s;95 °C 5 s,55 °C 30 s,40 个循环;溶解曲线分析为 65 °C 5 s,95 °C 0.5 s。

1.6 油菜 pre-miR172 家族成员二级结构分析

通过 RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 在线网站分析油菜 pre-miR172 家族成员,在默认参数条件下,预测其二级结构和自由能。

1.7 Pre-miR172 过表达对成熟 miR172 及 AP2 基因的影响

1.7.1 构建 pre-miR172 过表达载体 为鉴定 pre-miR172 对 miR172 成熟体表达水平的影响,克隆 pre-miR172 前体序列(包含发夹区域上下游各 100 bp 区域序列),并在序列 5' 端引入酶切位点 XhoI,3' 端引入 EcoRI 酶切位点。经过 XhoI 和 EcoRI 双酶切分别处理质粒 pGreen_GUS_competitor (addgene ID 55208) 和含 pre-miR172 序列的 T 载体,将 pre-miR172 连接到 pGreen_GUS_competitor 上,构建过表达载体。将已构建的过表达载体(实验组)和空载体 pGreen_GUS_competitor(对照组)分别转化至农杆菌 GV3101(成智博等,2019)。

1.7.2 农杆菌瞬时侵染油菜子叶及体内验证实验 将实验组和对照组的农杆菌分别进行瞬时侵染油菜子叶,具体方法参照谭小力等(2012)。侵染后

表 1 荧光定量 PCR 所需引物
Table 1 Primers required for fluorescence quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
Actin-F	CTGGTGATGGTGTCTCACAC
Actin-R	GTTGCTCATGGATTCCAGGAG
U6-F	CGATAAAATTGGAACGATACAGA
U6-R	ATTGGACCATTCTCGATTGT
DLAP2(通)-F	CTCACCACACAAACACTTGTTC
DLAP2(通)-R	GTCTGACCCGGTTAGGCTCAT
DLmiR172d-F	GCAGAATCTTGATGATGCTGCAG
DLmiR172b-F	GGAATCTTGATGATGCTGCAT
DLmiR172a-F	GCAGAATCTTGATGATGCTGCAT
DLmiR172c-F	GCAGAATCTTGATGATGCTGCAT
DL-pre-miR172c-F	GCCGCTAG TTGCAGATGC
DL-pre-miR172c-R	GCTGATG CAGCATCATCAAG
DL-pre-miR172d-F	CCGTAGATTCCTTCTCTTTTC
DL-pre-miR172d-R	GAACGCATCATCACAACCC
DL-pre-miR172b-F	TGGCTTTCTGAATCCTCTTCC
DL-pre-miR172b-R	GATGCTGCATCTGCAACTACC
DL-pre-miR172a-F	GGATCCGTTGAAGAAAGCTCA
DL-pre-miR172a-R	GCCGCTCG GTTGTGATGC

于 25 °C 条件下避光培养过夜,然后转移至 25 °C,光周期 16 h/8 h 条件下培养 3 d 后取样,对 miR172 和 *AP2* 基因进行 qRT-PCR 检测,具体方法同上。

1.8 数据处理

1.8.1 相关性分析 通过 Excel 软件分别对油菜 *AP2* 和 miR172 家族以及 miR172 家族和 pre-miR172 家族进行相关性分析,在 $P < 0.05$ 的条件下,相关系数 r 绝对值越接近 1,相关性越强。 $0 \leq |r| \leq 0.5$,基本不相关或低度相关; $0.5 < |r| \leq 0.8$,显著相关; $0.8 < |r| < 1$,高度相关; $|r| = 1$,完全相关。

1.8.2 差异显著性分析 利用 Microsoft Excel 2010 对实验所得数据进行单因素方差分析,计算所得 P 值小于 0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 油菜中 AP2 基因的鉴定

油菜基因组来源于白菜和甘蓝的杂交,选择

甘蓝和白菜中已鉴定的 *AP2* 基因,通过 BLAST 获得油菜中的同源序列,经过筛选去除重复序列,得到 9 条序列;经 TAPIR 网站预测 miR172 和 *AP2* 的互补配对位点(表 2),选择错配碱基数小于 3 的序列保留,最终得到 6 条 *AP2* 候选序列。其中,根据白菜 *AP2* 序列比对得到 2 条序列 XM_013887071 和 XM_048778068,其对应的蛋白序列为 XP_013742525 和 XP_048600981;根据甘蓝 *AP2* 序列比对得到 4 条序列 HQ637468、XM_048770445、XM_013887073 和 XM_048763426,其对应的蛋白序列为 ADU04499、CDY29538、XP_013742527 和 XP_048619383。

2.2 油菜 miR172 和 AP2 启动子区顺式调控元件的预测分析

截取 pre-miR172 和 *AP2* 基因上游 2 000 bp 作为启动子区,经 NewPLACE 网站预测分析,在 pre-miR172 和 *AP2* 启动子区发现存在 TATA-box、

CAAT-box 等核心启动子元件,光应答元件(G-box、AAAC-motif、Box4、GT-1 等,用于响应光照长度和光周期刺激),激素应答元件(ABRE、W-box、GARE、CGTCA、TGACG 等,用于响应乙烯、脱落酸、赤霉素、生长素、乙酰水杨酸、茉莉酸的刺激),生长发育应答元件(TATTAG,参与细胞分裂),逆境胁迫响应元件(MYB2、UP1-motif 等,参与响应水胁迫、损伤胁迫等机制),此外,启动子区还存在组织特异性元件(root-motif、POLLEN-ELEMENT,调控相应基因在根和花这些特定组织中表达)。这说明 miR172 和 *AP2* 可能参与调控开花过程。

2.3 油菜 AP2 系统发育分析

2.3.1 *AP2* 蛋白性质分析 由表 2 可知,*AP2* 蛋白由 357~433 个氨基酸组成;分子量为 39.7~47.9 kDa;等电点为 6.31~6.77,此外,亚细胞定位预测发现,6 条油菜 *AP2* 均位于细胞核,说明这 6 条 *AP2* 序列均属核基因,在细胞核内发挥不同功能。

表 2 油菜中 *AP2* 蛋白性质分析

Table 2 Analysis of *AP2* protein properties in rape

序列名称 Sequence name	靶标起点 Target start	靶标终点 Target end	氨基酸长度 Amino acid length	分子量 Molecular weight	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular location
XP_013742525	1 348	1 368	433	47 736.58	6.44	细胞核 Nucleus
XP_048600981	1 373	1 393	432	47 924.77	6.77	Nucleus 细胞核
ADU04499	1 178	1 198	432	47 757.47	6.31	Nucleus 细胞核
CDY29538	1 348	1 368	432	47 924.77	6.77	Nucleus 细胞核
XP_013742527	1 351	1 371	357	39 753.86	6.42	Nucleus 细胞核
XP_048619383	1 357	1 377	431	47 685.41	6.41	Nucleus 细胞核

2.3.2 油菜 *AP2* 的选择压力分析 对油菜中 6 个 *AP2* 候选序列与白菜(*Bra017809* 和 *Bra011741*) 和甘蓝(*KC584094*) 中 *AP2* 进行 k_a/k_s 计算,通过比较 k_a/k_s 进行选择压力分析。由表 3 可知,旁系同源基因 7 对,直系同源基因 6 对,全部 $k_a/k_s < 1$,表明 *AP2* 家族在进化过程中经历了强烈的纯化选择。

2.3.3 系统进化树分析 为进一步确定油菜 *AP2*、miR172 和 pre-miR172 各自的进化关系,利用 MEGA6 软件对多种植物的 *AP2* 家族、miR172 成熟序列和 pre-miR172 序列进行进化树分析,结果显示油菜 *AP2* 序列 XM_013887071、XM_

048770445、XM_013887073 与白菜 BraAP2-2 关系较近,XM_048763426 与甘蓝 BroAP2 关系较近(图 1:A)。Pre-miR172 进化树分析发现, bna-miR172a 与 bra-miR172a 关系最近; bna-miR172b 和 bna-miR172c 聚类在一组,和 bra-miR172d、ath-miR172e 关系较近; bna-miR172d 和 bra-miR172c 关系较近(图 1:C)。miR172 成熟序列的进化树分析,发现 miR172b 和 miR172c 聚类在一组(图 1:B),表明二者可能功能相似; miR172a 和 miR172d 分别聚类在其他组(图 1:B),可能与 miR172b、miR172c 的功能存在差异。

表 3 油菜 AP2 基因的选择压力分析
Table 3 Selection pressure analysis of rape AP2

类别 Category	基因 1 Gene 1	基因 2 Gene 2	ka	ks	ka/ks	选择压力 Selection pressure
直系同源 Orthologous	Bra017809	XM_013887071	0	0	—	—
	Bra011741	XM_048778068	0.002 0	0.006 6	0.303 0	纯化选择 Purifying selection
	KC584094	HQ637468	0.013 5	0	—	—
	KC584094	XM_048770445	0.025 0	0.085 8	0.291 3	纯化选择 Purifying selection
	KC584094	XM_013887073	0.025 0	0.085 8	0.291 3	纯化选择 Purifying selection
	KC584094	XM_048763426	0.006 2	0.048 6	0.127 5	纯化选择 Purifying selection
	旁系同源 Paralogous	HQ637468	XM_048770445	0.025 0	0.085 8	0.291 3
HQ637468		XM_013887073	0.025 0	0.085 8	0.291 3	纯化选择 Purifying selection
HQ637468		XM_048763426	0.006 2	0.048 6	0.127 5	纯化选择 Purifying selection
XM_048770445		XM_013887073	0	0	—	—
XM_048770445		XM_048763426	0.018 6	0.034 8	0.534 4	纯化选择 Purifying selection
XM_013887073		XM_048763426	0.018 6	0.034 8	0.534 4	纯化选择 Purifying selection
XM_048778068		XM_013887071.3	0.042 1	0.222 9	0.188 8	纯化选择 Purifying selection
						纯化选择 Purifying selection

2.3.4 AP2 蛋白基序分析 由图 2 可知,所有油菜 AP2 蛋白候选序列均存在 3 个保守基序(图 2: A),基序 1(Motif 1)和基序 2(Motif 2)高度保守,基序 3(Motif 3)有 3 个氨基酸位置保守性较低(图 2: B),说明不同油菜 AP2 基因功能的差异可能依赖于基序 3 来发挥。

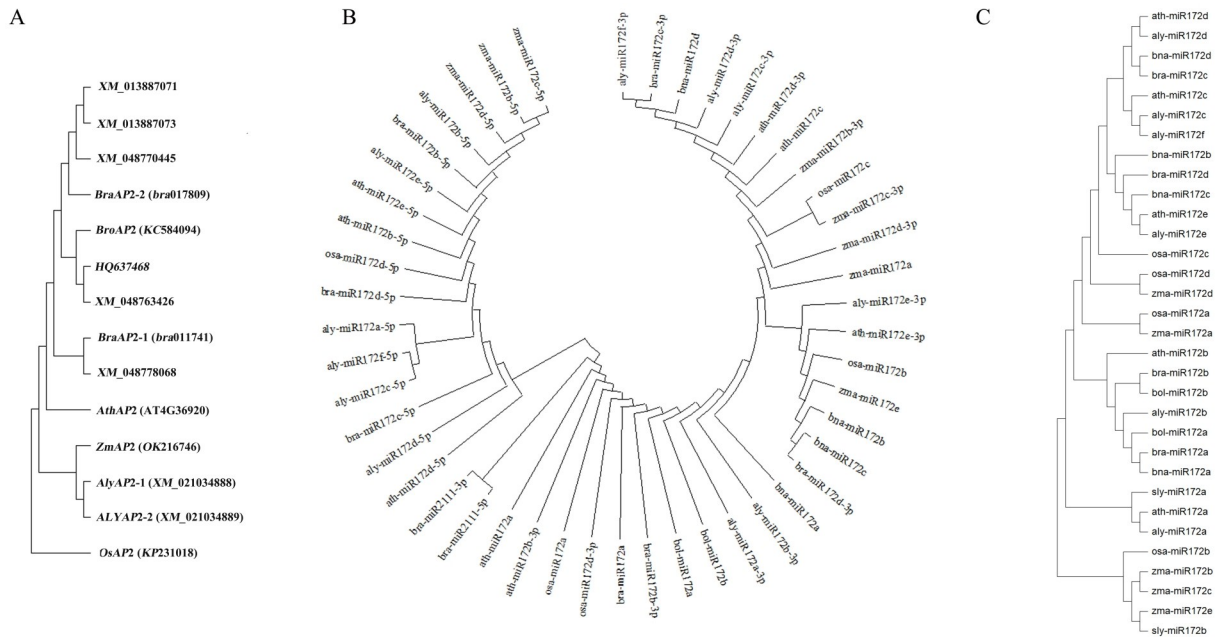
2.4 miR172 家族与 AP2 表达水平及二者相关性分析

由图 3 可知,AP2 在根和叶中的表达水平呈现为早熟低于晚熟,但在花中则早熟明显高于晚熟(图 3: A)。对于早熟油菜,根和叶中 AP2 表达量明显低于花的表达量;对于晚熟油菜则相反,呈现根和叶中 AP2 表达量高于花的。早熟油菜花中 AP2 表达量显著高于晚熟油菜花,初步推测 AP2 基因的综合作用结果是促进开花。

通过 miRBase 下载得到 4 条成熟油菜 miR172 家族成员,分别是 bna-miR172a、bna-miR172b、bna-miR172c 和 bna-miR172d。经过多重比对 miR172 家族成员和 AP2 基因,发现 4 个家族成员高度保守,仅存在 1 个碱基的差异,AP2 基因和 miR172 高度同源互补,仅有 1~3 个碱基的差异(图 3: F),初步推测这些 AP2 基因是 miR172 的靶基因。

通过 qRT-PCR 检测 miR172 家族的表达水平,结果如图 3: B-E 所示,miR172 家族在早熟和晚熟油菜的根、叶和花中均有表达,而且花中的表达水平普遍高于根和叶,只有 miR172d 在晚熟油菜花中的表达量低于根和叶。miR172a、miR172b 和 miR172c 在早熟油菜不同组织中的表达规律和 AP2 一致,花中表达量高于根和叶,说明 miR172a、miR172b 和 miR172c 对于早熟油菜 AP2 基因有促进表达的作用。在晚熟油菜中,miR172a 和 miR172c 在花中表达水平显著高于非花组织,但差距较小,说明 miR172a 和 miR172c 对于 AP2 基因虽表现为负调控,但作用较小;miR172b 在花中表达量高于非花组织,与 AP2 表达规律相反,说明在晚熟油菜中 miR172b 对于 AP2 起到负调控的作用。在早熟油菜中,miR172d 在不同组织之间表达量差异不显著,在晚熟油菜中 miR172d 表达规律和 AP2 一致,非花组织的表达量显著高于花的表达量,说明 miR172d 对于晚熟油菜 AP2 可能起正调控作用,而在早熟油菜中可能不发挥功能或作用微弱。

为进一步确定 miR172 家族各成员与 AP2 基因的关系,分析 AP2 和 miR172 家族各成员表达规



A. *AP2* 基因的进化树分析; B. miR172 进化树分析; C. pre-miR172 进化树分析。

A. Phylogenetic analysis of *AP2* gene; B. Phylogenetic analysis of miR172; C. Phylogenetic analysis of pre-miR172.

图 1 *AP2*、miR172、pre-miR172 的进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *AP2*, miR172 and pre-miR172

律之间的相关系数(r 值)和差异显著性(P 值),结果如表4所示,在早熟油菜中 miR172 家族各成员与 *AP2* 均呈显著或高度正相关,在晚熟油菜中 miR172d 与 *AP2* 呈高度正相关, miR172b 与 *AP2* 呈负相关, miR172a 和 miR172c 与 *AP2* 低度相关,说明在早熟油菜中 miR172 家族促进 *AP2* 表达,但在晚熟油菜中 miR172b 抑制 *AP2* 表达, miR172d 促进 *AP2* 表达。

综上所述,油菜 *AP2* 基因可能促进开花,而且其功能的发挥受到 miR172 的靶向调控。在早熟油菜中 miR172 家族促进 *AP2* 表达水平增加进而促进开花,但其中 miR172d 作用不明显。在晚熟油菜中, miR172a 和 miR172c 对于 *AP2* 的调控作用较小, miR172b 和 miR172d 二者共同发挥降低 *AP2* 的表达水平,从而抑制晚熟油菜的开花。

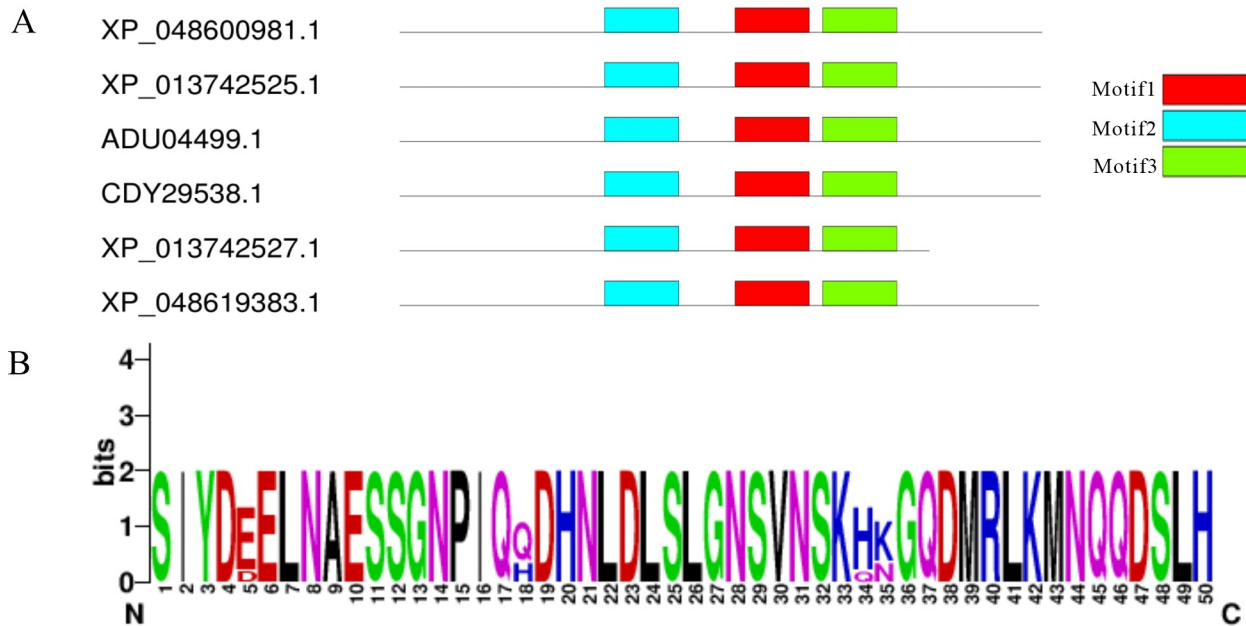
2.5 Pre-miR172 的二级结构分析

从 miRBase 下载到 4 个欧洲油菜 pre-miR172 家族成员, 4 个白菜 pre-miR172 家族成员, 2 个甘蓝 pre-miR172 家族成员。利用 RNAfold (3.2) 软件预测油菜、白菜和甘蓝的 pre-miR172 家族基因二级结构,结果如表5所示,pre-miR172 的基本二级结构均为茎环结构,其自由能为 40.3~67.7 kcal·mol⁻¹,其

中欧洲油菜 pre-miR172c 的二级结构自由能最高,欧洲油菜 pre-miR172a 的二级结构自由能最低。由图4可知,白菜和甘蓝 pre-miR172a 二级结构一致,但由于 5'端缺少 CGUU 4 个碱基,3'端缺少 CGACC 5 个碱基,导致其在油菜中的二级结构缺少 1 个环区和部分茎部碱基配对,致使自由能下降 3.1 kcal·mol⁻¹;pre-miR172b 在白菜和甘蓝中的二级结构一致,但欧洲油菜中则由于碱基差异,导致其茎部碱基配对数目增加,同时,虽然同为 5 个环区,但欧洲油菜中的环更小,因此二级结构自由能增加,稳定性更强。与白菜相比,欧洲油菜 pre-miR172c 整体碱基数更多,茎部配对数目更多,导致自由能更高,二级结构更稳定;欧洲油菜 pre-miR172d 相较于白菜多形成了 1 个环区,自由能降低,二级结构稳定性更弱一些。欧洲油菜中 pre-miR172a 的稳定性最低,然后依次是 pre-miR172d、pre-miR172b, pre-miR172c 稳定性最强。

2.6 miR172 与 pre-miR172 功能的相关性分析

通过 qRT-PCR 检测 pre-miR172 家族各成员的表达水平,将 pre-miR172 家族和 miR172 家族表达量进行对比,发现在早熟油菜和晚熟油菜花中 pre-miR172a 表达量高于根和叶, miR172a 也随之



A. 基序预测; B. 基序 3 序列标志图。

A. Motif prediction; B. Sequence logo view of Motif 3.

图 2 油菜 AP2 蛋白基序预测图

Fig. 2 Prediction of AP2 motif in rape

表 4 miR172 家族与 AP2 的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between miR172s and AP2

家族 Family	Z-AP2		W-AP2	
	r 值 r value	P 值 P value	r 值 r value	P 值 P value
miR172a	0.923	0.047	-0.261	0.023
miR172b	0.859	0.045	-0.989	0.048
miR172c	0.923	0.047	-0.261	0.023
miR172d	0.743	0.005	0.880	0.045

注: $P < 0.05$ 表示差异显著; **Z-AP2**. 早熟油菜 AP2 基因; **W-AP2**. 晚熟油菜 AP2 基因。

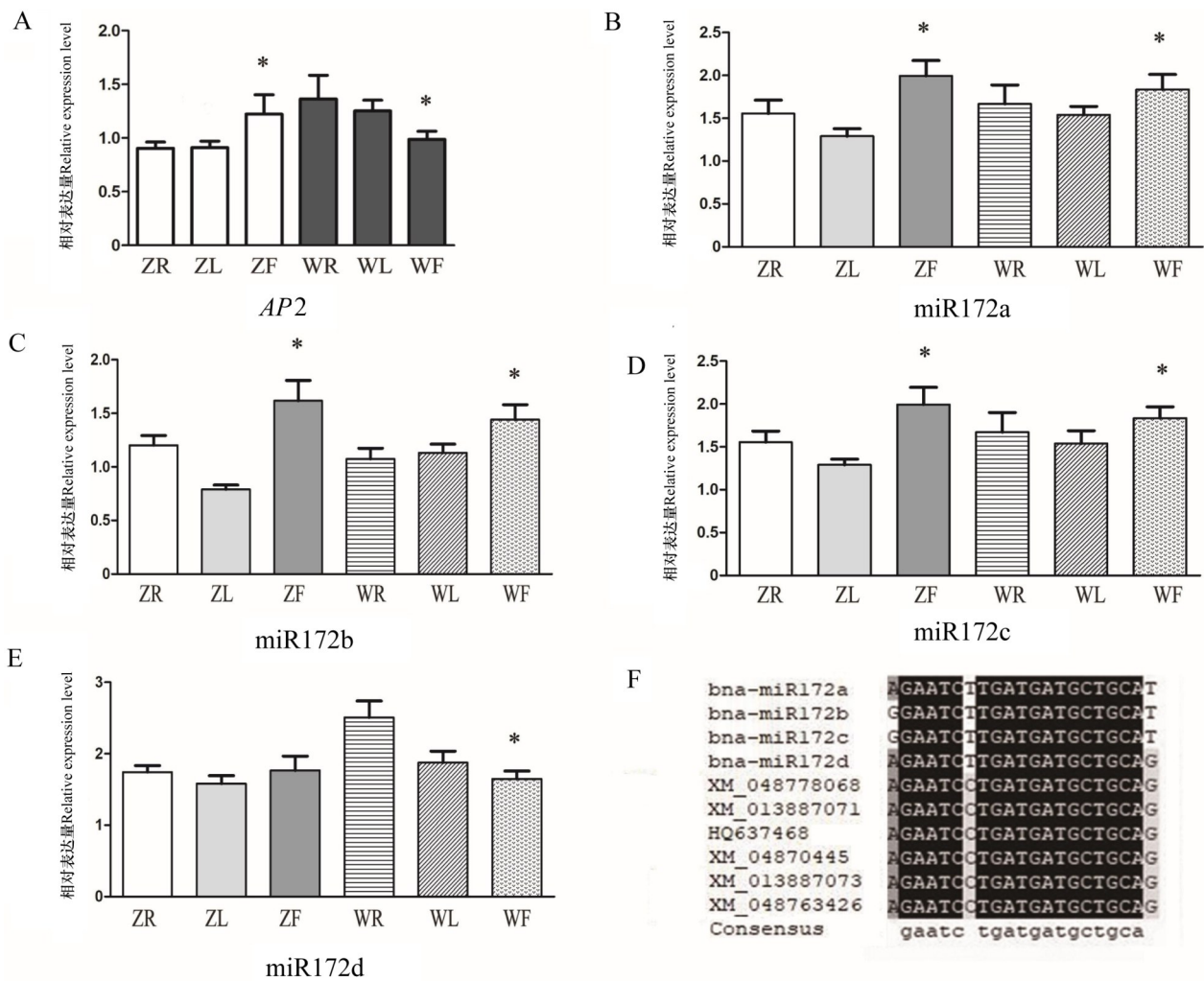
Note: $P < 0.05$ indicates significant differences; **Z-AP2**. AP2 gene in early maturing rape; **W-AP2**. AP2 gene in late maturing rape.

在花中呈现最高表达量(图 5: A), 说明 pre-miR172a 对于 miR172a 的形成有促进作用;但在晚熟油菜中, miR172a 的变化幅度明显高于 pre-miR172a 的变化幅度(图 5: A), 说明除了 pre-miR172a 表达丰度对 miR172a 的形成发挥促进作用, 可能还存在其他加工层面的调控参与。pre-miR172b 与对应的成熟体序列表达趋势一致, 不

同组织中前体序列表达量增加, 成熟序列的表达量也随之增加(图 5: B), 说明 pre-miR172b 对 miR172b 的形成具有促进作用。pre-miR172c 和 pre-miR172d 早熟油菜花中表达量高于非花组织, miR172c 和 miR172d 与其前体保持同样的表达规律, 说明 pre-miR172c 和 pre-miR172d 对于早熟油菜 miR172c 和 miR172d 的形成同样具有促进作用;但在晚熟油菜中, pre-miR172c 和 pre-miR172d 的表达规律与其相应成熟体表达趋势相反(图 5: C, D), 说明在晚熟油菜中 pre-miR172c 和 pre-miR172d 对于其成熟体的形成具有负作用。

为进一步确定 miR172 的功能发挥与 pre-miR172 的关系, 分析 miR172 和 pre-miR172 表达水平间的相关系数(表 6), 结果发现在早熟和晚熟品种中表现出一致的规律, miR172a 和 pre-miR172a 间显著正相关。miR172d 和 pre-miR172d 间显著相关, 但在早熟品种中表现为正相关, 在晚熟品种中表现为负相关, 说明成熟序列 miR172a 和 miR172d 的形成与相应前体表达丰度高低具有显著的相关关系。

综合上述结果, pre-miR172 家族对于早熟油



A. 油菜 *AP2* 表达规律图; **B-E.** 油菜 miR172 家族成员表达规律图; **F.** 油菜 miR172 家族与 *AP2* 基因比对图。ZR、ZL、ZF 分别代表早熟油菜根、叶、花; WR、WL、WF 分别代表晚熟油菜根、叶、花; * 表示差异显著,下同。

A. *AP2* expression pattern in rape; **B-E.** Expression pattern of miR172 family members in rape; **F.** Comparison map of miR172s and *AP2* gene in rape. ZR, ZL, and ZF represent the roots, leaves, and flowers of early maturing rape; WR, WL, and WF represent the roots, leaves, and flowers of late maturing rape; * indicate significant differences, the same below.

图 3 *AP2*、miR172 家族表达规律分析及序列比对

Fig. 3 Analysis of *AP2* and miR172s expression pattern and sequence alignment

菜中 miR172 的表达水平具有促进作用,其中 miR172a 和 miR172d 的表达水平主要受 pre-miR172a 和 pre-miR172d 丰度的调控。在晚熟油菜中 pre-miR172a 和 pre-miR172b 对其成熟序列的形成发挥正向调控,pre-miR172c 和 pre-miR172d 则对于其成熟序列的形成发挥负向调控。

2.7 Pre-miR172 对 miR172 及 *AP2* 表达水平影响

通过携带 pre-miR172 过表达质粒的农杆菌侵染油菜子叶进行体内验证实验,结果如图 6 所示,

早熟油菜子叶中 pre-miR172 过表达均导致其对应的成熟体表达量高于对照组 (ck),但其中 miR172b 与对照组相比差异不显著(图 6: A),可见基本上,在早熟油菜中 pre-miR172 促进其成熟体的形成;晚熟油菜子叶中 miR172a 和 miR172b 表达量高于对照组,miR172c 和 miR172d 则显著低于对照组(图 6: B),表明前二者促进其成熟体形成,后二者抑制其成熟体形成。早熟油菜子叶中 pre-miR172 过表达后发现 *AP2* 基因表达水平显

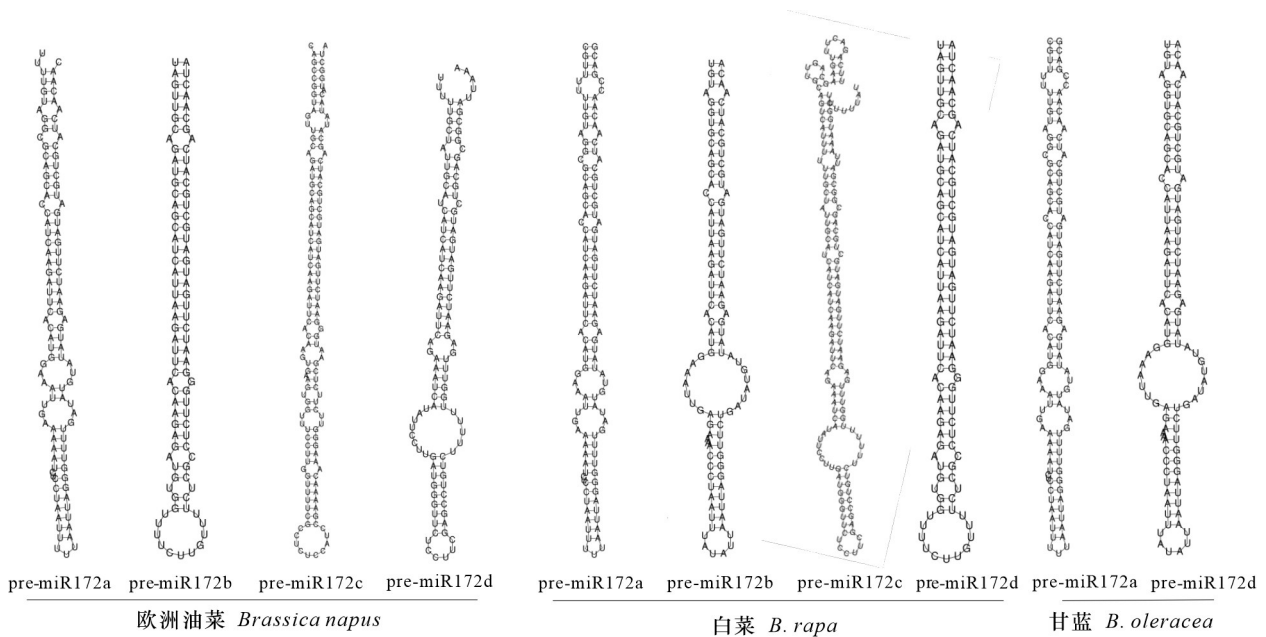


图 4 油菜、白菜、甘蓝中 pre-miR172 家族二级结构预测图

Fig. 4 Prediction of the secondary structure of pre-miR172s in rape, Chinese cabbage, and cabbage

著高于对照组(图 6: C),晚熟油菜子叶中过表达 pre-miR172b 时 AP2 表达量低于对照组,过表达 pre-miR172d 时 AP2 表达量高于对照组,过表达 pre-miR172a 和 pre-miR172c 时 AP2 表达水平略低于对照组,但差异不显著(图 6: D)。过表达后 AP2 的表达规律与正常油菜中的表达规律一致,再次证明 miR172 靶向调控 AP2 基因。

3 讨论

3.1 AP2 参与油菜花发育

在拟南芥中,AP2 除了在花发育过程中表达,在非花组织茎和叶中也有表达,但在非花组织的表达水平较低,在花序分生组织和幼嫩花蕾中表达增强(赵奇等,2005)。本研究发现,AP2 在油菜根、叶和花中均有表达,在早熟油菜的花中 AP2 表达量最高,与之规律一致;在晚熟油菜的根中 AP2 表达量较高,而花中却较低,初步推测获得的油菜 AP2 序列综合作用后可以正向调控开花的进行。Wang 等(2019)认为其发现的 euAP2 家族成员中部分序列发挥负调控作用,其他成员在其所选样本中表达水平无明显差异。这与本研究结果不同,第一,筛选的候选 AP2 序列存在差异,可能导

致检测结果不同;第二,本研究选择所有候选 AP2 序列的保守区设计的通用引物,并未分别检测每个家族成员的表达水平,其中发挥正向和负向调控作用的成员综合作用后呈现了正向调控的效果,这也可能是与前人结果不同的原因。

3.2 miR172 对 AP2 的调控

基因表达受到不同水平的调控,包括染色体水平、转录水平、转录后水平和翻译水平等。转录因子在转录水平中发挥重要作用,转录因子主要通过与其靶基因启动子区的 DNA 结合位点结合,激活或抑制下游基因的转录水平,进而起到调控基因表达的作用(Vaqueizas et al., 2009)。Saito 等(2009)研究发现,转录因子可以与 miRNA 的启动子区结合,从而调节 miRNA 表达,miRNA 通过与靶基因的 3'UTR 区特异性结合,进而在转录后水平抑制靶基因表达或者降解靶 mRNA。转录因子和 miRNA 的有机结合增加了基因表达调控网络的复杂性(熊莉丽等,2014)。

AP2 亚家族作为转录因子 AP2/ERF 基因家族成员之一,包含 ANT 和 euAP2 两种类型,其中 euAP2 家族成员均含有 miR172 的结合位点。本研究获得的油菜 AP2 序列,与 miR172 比对后呈现 1~3 个碱基的错配,均含有 miR172 的结合位点,

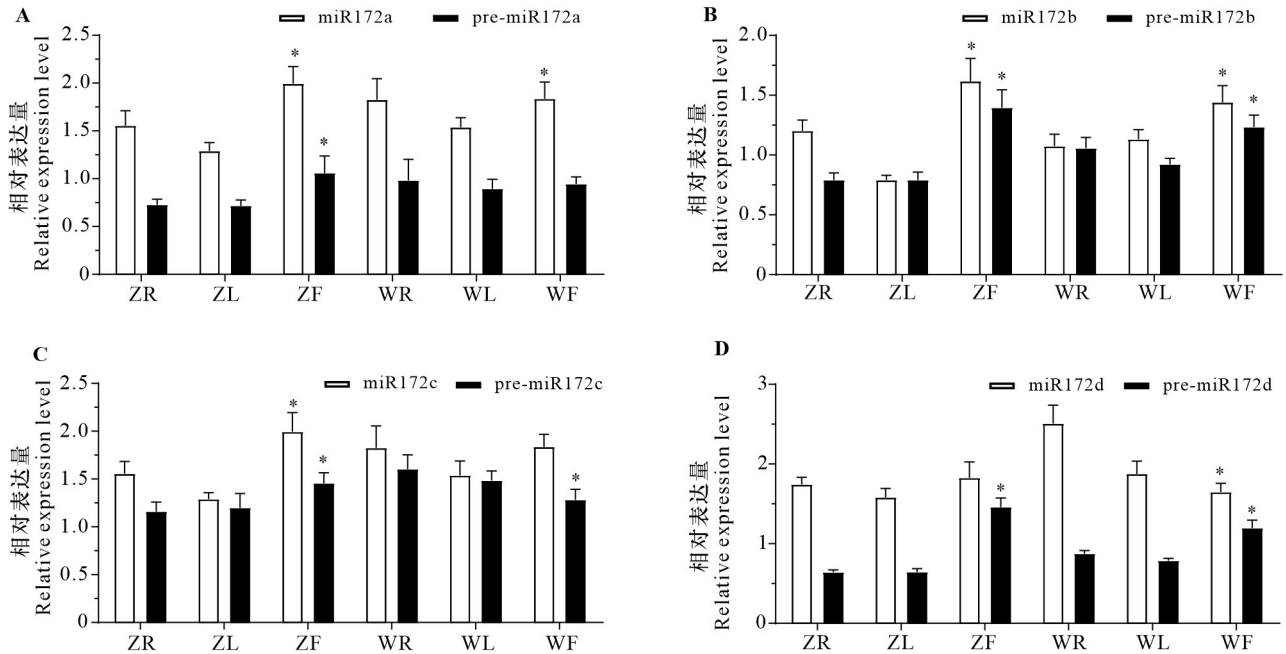
表 5 油菜、白菜和甘蓝中 pre-miR72 家族的二级结构稳定性分析

Table 5 Secondary structure stability analysis of pre-miR72s in rape, Chinese cabbage and cabbage

来源 Origin	名称 Name	自由能 ΔG (kcal · mol ⁻¹)	二级结构 Secondary structure
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	pre-miR172a	-40.3	UUUUGUAGGCGCAGCACCAUCAAGAUUCACAUGGAAAUGAAAAUCUCCUAA UUUUAAUUAGGGUUUGAUUGUAUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCA CAAC .. ((((. ((. ((((((((((((((((. (((... ((... ((((((((((((...)))))))))))))...)))))))))...)))))))).)))))).)))))))).
	pre-miR172b	-53.4	UAGUUGCAGAUGCAGCAUCAUAAGAUUCACAAGAGAUGGGUUUCUUGUUU UCUCGCCUCUUGGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCAGCAACUA ((((((((.....)))))...)))))))))...)))))))).)))))))). (((.....))...)))))))))...)))))))).)))))))).
	pre-miR172c	-67.7	CAGCGGUAGUUGCAGAUGCAGCAUCAUAAGAUUCACAAGUGAAGUGGUUUC UUGGUUUCGCCUCUCAUCGAAAAACAAGGGUUCUCUGAAUGGGAAUCU GAUGAUGCUGCAUCAGCAUAUACAUUGGCUA . ((((((((. ((. ((((((((((((((((((((((((. ((. ((. ((. ((. ((((((((((((...)))))))))))))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).
	pre-miR172d	-49.4	UUUUUGCUAUUGCAUCAUCAAGAUUCAGAAAUCAUUAUCCUUGAUGGGUUC UCCUUCGAGCCUGUCUUUUUGGUUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAGCGGC AUUAAA ... (((((((.....)))))...)))))))))...)))))))).)))))))). ((((.....))...)))))))))...)))))))).)))))))).
白菜 <i>B. rapa</i>	pre-miR172a	-43.4	CGUUUUUGUAGGCGCAGCACCAUCAAGAUUCACAUGGAAAUGAAAAUCUCC UAAUUUUAAUUAGGGUUUGAUUGUAUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU CAACAACCGAGC (((... (((. ((. ((((((((((((((((. (((... ((... ((((((((((((...)))))))))))))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).
	pre-miR172b	-46.5	UGUAGGUGCAGCACCAUUAAGAUUCACAUGGAAAUGAGAAAACCCUAAUUUAU AUUAAUUAGGGUUCUGAUUGUAUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCAACA (((.....))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).
	pre-miR172c	-58.6	UUCAGACUUUGAAGCAGUUGCAGUCAUUUUUGCUAUUGCAUCAUCAAGAU UCAGAAAUCAUUAUCCUUGAUGGGUUCUCCUUCGAGCCUGUCUUUUUGGUUUG AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAGCGCGAUUAAUGGCUUUUUUAU ((((.....)) ((...)) ((((((((. ((((. ((((. ((((((((((((((((. ((((.....))...)))))))))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).
	pre-miR172d	-53.4	UAGUUGCAGAUGCAGCAUCAUAAGAUUCACAAGAGAUGGGUUUCUUGUUU UCUCGCCUCUUGGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCAGCAACUA ((((((((.....)))))...)))))))))...)))))))).)))))))). (((.....))...)))))))))...)))))))).)))))))).
甘蓝 <i>B. oleracea</i>	pre-miR172a	-43.4	CGUUUUUGUAGGCGCAGCACCAUCAAGAUUCACAUGGAAAUGAAAAUCUCC UAAUUUUAAUUAGGGUUUGAUUGUAUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU CAACAACCGAGC (((... (((. ((. ((((((((((((((((. (((... ((... ((((((((((((...)))))))))))))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).
	pre-miR172b	-46.5	UGUAGGUGCAGCACCAUUAAGAUUCACAUGGAAAUGAGAAAACCCUAAUUUAU AUUAAUUAGGGUUCUGAUUGUAUUGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAUCAACA (((.....))...)))))))))...)))))))).)))))))).)))))))).)))))))).

初步认为获得的 AP2 序列均属 euAP2 家族成员。拟南芥 miR172 已被证实通过切割 euAP2 和抑制蛋白翻译的方式调控 AP2 基因的表达 (Aukerman &

Sakai, 2003; Chen, 2004)。通过分析油菜 miR172 和 AP2 表达规律间的相关性, 本研究发现 miR172 家族丰度在早熟油菜中与 AP2 表达水平显著或高



A. miR172a 与 pre-miR172a 表达规律比较; **B.** miR172b 与 pre-miR172b 表达规律比较; **C.** miR172c 和 pre-miR172c 表达规律比较; **D.** miR172d 与 pre-miR172d 表达规律比较。ZR、ZL、ZF 分别代表早熟油菜根、叶、花; WR、WL、WF 分别代表晚熟油菜根、叶、花。

A. Comparison of expression patterns between miR172a and pre-miR172a; **B.** Comparison of expression patterns between miR172b and pre-miR172b; **C.** Comparison of expression patterns between miR172c and pre-miR172c; **D.** Comparison of expression patterns between miR172d and pre-miR172d. ZR, ZL, and ZF represent the roots, leaves, and flowers of early maturing rape; WR, WL, and WF represent the roots, leaves, and flowers of late maturing rape.

图 5 miR172 家族与 pre-miR172 家族表达规律比较分析

Fig. 5 Comparative analysis of expression patterns of miR172s and pre-miR172s

度正相关。但是,在晚熟油菜中仅 miR172b 和 miR172d 丰度与 AP2 表达量高度相关,而且前者为负相关,后者为正相关,miR172a 和 miR172c 表达丰度与 AP2 表达量低度相关。这表明 miR172 在不同油菜品种中对于 AP2 调控功能的发挥存在差异。推测 miR172 家族成员对于 AP2 基因的调控不仅依赖于表达丰度,还存在加工层面的调控,致使在不同油菜品种中 miR172 家族成员的功能发挥有所不同。在早熟油菜中 miR172 家族成员对 AP2 表达水平起促进作用;在晚熟油菜品种中仅 miR172d 发挥促进作用,miR172a、miR172b 和 miR172d 的作用可能经过加工后被削弱甚至不能发挥,导致其与 AP2 的关系不具备相关性,甚至呈负相关。

3.3 Pre-miR172 调节 miR172 的表达水平

关于 miRNA 的研究大多集中在 miRNA 成熟体,有关 pre-miRNA 的报道较少。植物 pre-miRNA

对于成熟体 miRNA 的功能发挥有着重要意义。本研究通过检测 pre-miR172 和 miR172 表达量以及对二者进行相关性分析,发现 miR172 的表达量与 pre-miR172 的丰度有关,其中 pre-miR172a 和 miR172a 及 pre-miR172d 和 miR172d 高度或显著相关,pre-miR172b 和 miR172b 及 pre-miR172c 和 miR172c 在丰度上不呈现线性相关,可能是因为 miR172 丰度不仅受到前体丰度调控,还受到加工层面的调控,所以单从表达量上不表现出线性相关。张俊红等(2012)在落叶松胚珠中同样发现这一规律,miR156、miR166、miR397、miR398、miR408 丰度与其前体表达量均不呈现线性相关,认为其可能是受到加工调控;miR166 在前 4 个发育阶段与前体表达量呈线性相关,认为在前 4 个阶段 miR166 成熟体受到前体丰度调控,到后期受到加工调控。

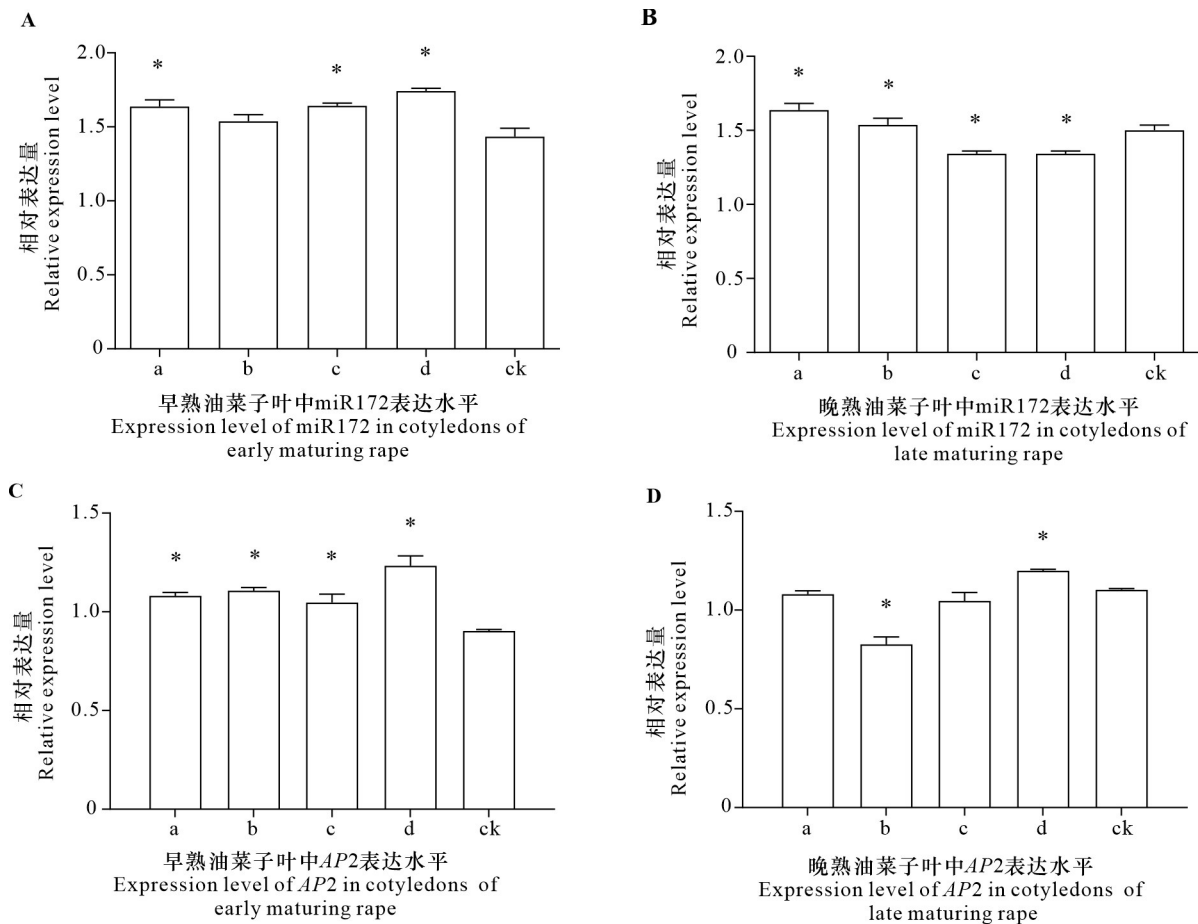
在晚熟油菜中发现,pre-miR172a 和 miR172a 的

表 6 Pre-miR172 家族与 miR172 家族间的相关性分析
Table 6 Correlation analysis between pre-miR172s and miR172s

品种 Variety	pre-miR172a-miR172a		pre-miR172b-miR172b		pre-miR172c-miR172c		pre-miR172d-miR172d	
	r 值 r value	P 值 P value	r 值 r value	P 值 P value	r 值 r value	P 值 P value	r 值 r value	P 值 P value
Z	0.939	0.029	0.867	0.536	0.876	0.202	0.752	0.046
W	0.889	0.001	0.826	0.375	-0.183	0.109	-0.549	0.021

注: $P < 0.05$ 表示差异显著; **Z**. 早熟油菜; **W**. 晚熟油菜。

Note: $P < 0.05$ indicates significant differences; **Z**. Early maturing rape; **W**. Late maturing rape.



A. 瞬时转染后早熟油菜子叶中 miR172 表达水平比较; **B**. 瞬时转染后晚熟油菜子叶中 miR172 表达水平比较; **C**. 瞬时转染后早熟油菜子叶中 AP2 表达水平比较; **D**. 瞬时转染后晚熟油菜子叶中 AP2 表达水平比较。a, b, c 和 d 分别表示 pre-miR172a、pre-miR172b、pre-miR172c 和 pre-miR172d 过表达质粒感染油菜子叶; ck 表示空白质粒 pGreen_GUS_competitor 感染油菜子叶。

A. Comparison of miR172 expression levels in early maturing rape cotyledons after transient transfection; **B**. Comparison of miR172 expression levels in late maturing rape cotyledons after transient transfection; **C**. Comparison of AP2 expression levels in early maturing rape cotyledons after transient transfection; **D**. Comparison of AP2 expression levels in late maturing rape cotyledons after transient transfection. a, b, c, and d respectively represent pre-miR172a, pre-miR172b, pre-miR172c, and pre-miR172d overexpression plasmids infecting rape cotyledons; ck represent blank plasmid pGreen_GUS_competitor infection of rape cotyledons.

图 6 Pre-miR172 过表达质粒感染油菜子叶后 miR172 及 AP2 表达情况

Fig. 6 Expression of miR172 and AP2 after pre-miR172 overexpression plasmid infecting rape cotyledons

相关系数为 0.889, 表现为显著正相关, 过表达 pre-miR172a 后 miR172a 的表达量也显著提高, 说明 pre-miR172a 对于 miR172a 表达水平有正向调控作用; pre-miR172a 表达量在根、叶、花中变化幅度不大, 而 miR172a 变化幅度较大, 这可能是由于 pre-miR172a 相对于成熟体更加不稳定, 容易发生降解 (Schmittgen et al., 2008), 因此不能完全检测到。pre-miR172a 自由能相较于其他家族成员最低, 也表明其稳定性更低, 容易降解。pre-miR172b 和 miR172b 基本表现一致的表达规律, 但二者不呈现线性关系, 推测 pre-miR172b 对成熟体 miR172b 还有其他层面的加工调控。过表达 pre-miR172b 后, miR172b 表达水平显著提高。pre-miR172c 和 miR172c 表达量在晚熟油菜中呈现相反的趋势, 同时, 过表达 pre-miR172c 后, miR172c 表达水平降低且二者不呈现线性相关, 可能是由于晚熟油菜中 miR172c 形成后, 其前体 pre-miR172 发生了降解, 因此检测到的前体表达量较低, 但成熟体表达量较高。pre-miR172d 与 miR172d 在晚熟油菜中呈负相关, 表明 pre-miR172d 丰度的增加会抑制 miR172d 的形成, 过表达 pre-miR172d 后, miR172d 的表达水平显著降低, 进一步证明在表达水平上 pre-miR172d 对 miR172d 起抑制作用。

耿立英等 (2015) 研究表明 pre-miRNA 种子区的单个碱基的差异就足以导致 miRNA 成熟体功能的不同, 从而调控不同靶基因。油菜中 miR172 序列差异较小, 但在不同材料不同组织中表达水平差异较大, 其原因可能在于前体的调节, 前体的调节方式不仅仅局限于丰度调节, 还有加工层面的调控, 有待进一步的研究。

4 结论

本研究分析 miR172 和 AP2 的启动子区, 发现均存在调控花发育的顺式元件, 可能参与花发育的调控。获得的 6 条 AP2 序列均具备 miR172 的结合位点, 属 miR172 的靶基因, 说明 AP2 可能受到 miR172 的调控。在早熟油菜中, miR172 家族成员均可促进 AP2 表达, 其中 miR172d 作用不显著。在晚熟油菜中, 主要是 miR172b 和 miR172d 共同作用降低 AP2 的表达水平。miR172 的形成受到其前体的调节, 在早熟油菜中, pre-miR172 家

族促进 miR172 家族的表达; 在晚熟油菜中 pre-miR172a 和 pre-miR172b 正向调控其成熟体的形成, pre-miR172c 和 pre-miR172d 则对于其成熟体的形成发挥负调控作用。

参考文献:

- AUKERMAN MJ, SAKAI H, 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes [J]. *Plant Cell*, 15(11): 2730-2741.
- CHEN L, LU HQ, LI RH, et al., 2018. Research progress and prospect of miRNA in *Brassica napus* [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 40(5): 664-673. [陈丽, 鲁海琴, 李日慧, 等, 2018. 油菜 miRNA 研究现状与展望 [J]. *中国油料作物学报*, 40(5): 664-673.]
- CHEN X, 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 303(5666): 2022-2025.
- CHENG L, ZHAO T, WU YX, et al., 2020. Identification of AP2/ERF genes in apple (*Malus × domestica*) and demonstration that *MdERF017* enhances iron deficiency tolerance [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 143(2): 465-482.
- CHENG ZB, WANG HT, ZHAO Q, et al., 2019. MiRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p responded to Cd stress by targeting MSH6 gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chin J Ecol*, 38(12): 3738-3746. [成智博, 王鹤潼, 赵强, 等, 2019. 拟南芥 miRNA172b-5p, miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 靶向 MSH6 基因参与 Cd 应激响应 [J]. *生态学杂志*, 38(12): 3738-3746.]
- CHUCK G, MEELEY R, IRISH E, et al., 2007. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1 [J]. *Nat Genet*, 39(12): 1517-1521.
- FRANÇOIS L, VERDENAUD M, FU XP, et al., 2018. A miR172 target-deficient AP2-like gene correlates with the double flower phenotype in roses [J]. *Sci Rep*, 8(1): 12912.
- GENG LY, ZHANG CS, ZHAO SY, et al., 2015. Polymorphism of pre-microRNA-1658 gene in chicken [J]. *Sci Agric Sin*, 48(19): 3919-3930. [耿立英, 张传生, 赵书雨, 等, 2015. 鸡 mir-1658 前体基因多态性分析 [J]. *中国农业科学*, 48(19): 3919-3930.]
- GHORBANI R, ZAKIPOUR Z, ALEMZADEH A, et al., 2020. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brassica napus* [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 26(7): 1463-1476.
- HU QH, UPADHYAYA NM, GUBLER F, et al., 2009. Overexpression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*) [J]. *BMC Plant Biol*, 9(1): 149.
- HUIJSER P, SCHMID M, 2011. The control of developmental phase transitions in plants [J]. *Development*, 138(19): 4117-4129.
- JI LJ, LIU XG, YAN J, et al., 2011. ARGONAUTE10 and

- ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 7(3): e1001358.
- JOFUKU KD, DEN BG, VAN MM, et al., 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *Plant Cell*, 6(9): 1211–1225.
- LEE YS, LEE DY, CHO LH, et al., 2014. Rice miR172 induces flowering by suppressing *OsIDS1* and *SNB*, two *AP2* genes that negatively regulate expression of *Ehd1* and florigens [J]. *Rice*, 7(1): 1–13.
- LI XY, GUO F, MA SY, et al., 2019. Regulation of flowering time via miR172-mediated *APETALA2-like* expression in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) [J]. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 20(4): 322–331.
- LICAUSI F, GIORGI FM, ZENONI S, et al., 2010. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera* [J]. *BMC Genomics*, 11(1): 719.
- LIU Q, AXTELL MJ, 2015. Quantitating plant microRNA-mediated target repression using a dual-luciferase transient expression system [J]. *Methods Mol Biol*, 1284: 287–303.
- MA X, 2017. Preliminary study on Ramie flower development related AP2/ERF gene [D]. Changsha: Hunan Agriculture University: 1–63. [马鑫, 2017. 苧麻花发育相关 AP2/ERF 类基因的初步研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学: 1–63.]
- NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, et al., 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 140(2): 411–432.
- NEOGY A, GARG T, KUMAR A, et al., 2019. Genome-wide transcript profiling reveals an auxin-responsive transcription factor, OsAP2/ERF-40, promoting rice adventitious root development [J]. *Plant Cell Physiol*, 60(10): 2343–2355.
- PARK W, LI JJ, SONG RT, et al., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 12(17): 1484–1495.
- PHILLIPS JR, DALMAY T, BARTELS D, 2007. The role of small RNAs in abiotic stress [J]. *FEBS Lett*, 581(19): 3592–3597.
- SCHMITTGEN TD, LEE EJ, JIANG J, et al., 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA [J]. *Methods*, 44(1): 31–38.
- SHEN EH, ZOU J, FALK HB, et al., 2015. Identification, evolution, and expression partitioning of miRNAs in allopolyploid *Brassica napus* [J]. *J Exp Bot*, (22): 7241–7253.
- SHIVARAJ SM, JAIN A, SINGH A, 2018. Highly preserved roles of *Brassica MIR172* in polyploid *Brassica*: ectopic expression of variants of *Brassica MIR172* accelerates floral transition [J]. *Mol Genet Genom*, 293(5): 1121–1138.
- SHIVARAJ SM, SINGH A, 2016. Sequence variation in *Brassica AP2* and analysis of interaction of AP2-miR172 regulatory module [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 125(2): 191–206.
- SPANUDAKIS E, JACKSON S, 2014. The role of microRNAs in the control of flowering time [J]. *J Exp Bot*, 65(2): 365–380.
- TAN XL, ZHUGE RJ, LI GY, et al., 2012. An agrobacterium-mediated transit transformation system in *Brassica napus* cotyledon [J], *J Biol*, 29(6): 93–96. [谭小力, 诸葛锐军, 李冠英, 等, 2012. 农杆菌介导的油莱子叶瞬时表达 [J]. *生物学杂志*, 29(6): 93–96.]
- TRUPIANO D, YORDANOV Y, REGAN S, et al., 2013. Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in *Populus* [J]. *Planta*, 238(2): 271–282.
- TSAFTARIS AS, PASENTSIS K, MADESES P, et al., 2012. Sequence characterization and expression analysis of three APETALA2-like genes from saffron crocus [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 30(2): 443–452.
- VAQUERIZAS JM, KUMMERFELD SK, TEICHMANN SA, et al., 2009. A census of human transcription factors: function, expression and evolution analysis [J]. *Nat Rev Genet*, 10(4): 252–263.
- WANG TY, PING XK, CAO YR, et al., 2019. Genome-wide exploration and characterization of miR172/euAP2 genes in *Brassica napus* L. for likely role in flower organ development [J]. *BMC Plant Biol*, 19(1): 1–15.
- WANG YN, SU C, ZOU YM, et al., 2016. Research progress of microRNA172 in plant development and stress responses [J]. *Chin Bull Life Sci*, 28(6): 645–654. [王幼宁, 苏超, 邹敏敏, 等, 2016. MicroRNA172 参与植物生长发育及逆境响应的研究进展 [J]. *生命科学*, 28(6): 645–654.]
- XIONG LL, ZHANG B, GUO ZY, 2014. MicroRNA and transcription factor regulatory network [J]. *J Chongqing Univ (Nat Sci Ed)*, 37(6): 33–37. [熊莉丽, 张宝, 郭志云, 2014. MicroRNA 与转录因子调控网络综述 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 37(6): 33–37.]
- ZHANG JH, ZHANG SG, WU T, et al., 2012. Expression of five miRNA precursors and mature bodies during somatic embryo development in *Larix gmelinii* [J]. *Chin Bull Bot*, 47(5): 462–473. [张俊红, 张守攻, 吴涛, 等, 2012. 落叶松体胚发育中 5 个 miRNA 前体与成熟体的表达 [J]. *植物学报*, 47(5): 462–473.]
- ZHANG XY, TIAN YH, QIN YZ, et al., 2021. The role of miR169 family members in the processes of growth, development and abiotic stress response in planta [J]. *J Plant Genet Resour*, 22(4): 900–909. [张幸媛, 田宇豪, 秦玉芝, 等, 2021. MiR169 在植物生长发育与非生物胁迫响应中的作用 [J]. *植物遗传资源学报*, 22(4): 900–909.]
- ZHAO Q, WANG T, WEI XD, 2005. Function of AP2 gene during floral organs development in higher plant review [J]. *Chin J Trop Agric*, 25(3): 50–56. [赵奇, 王台, 魏小弟, 2005. AP2 基因在高等植物花器官发育中的作用概述 [J]. *热带农业科学*, 25(3): 50–56.]
- ZHAO XH, KONG FJ, LIU BH, 2017. Research progress of miR172 and its targets in regulation of flowering and development [J]. *Heilongjiang Agric Sci*, (2): 126–130. [赵晓晖, 孔凡江, 刘宝辉, 2017. 植物 miR172 及其靶基因调控开花与发育的研究进展 [J]. *黑龙江农业科学*, (2): 126–130.]
- ZHAO Y, CHENG SF, SONG YL, et al., 2015. The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling [J]. *Plant Cell*, 27(9): 2469–2483.