DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04144

花生荚果发育过程中的 microRNA 鉴定与表达分析

胡冬秀** 刘浩** 洪彦彬 梁炫强 陈小平*

广东省农作物遗传改良重点实验室 / 国家油料作物改良中心南方分中心 / 广东省农业科学院作物研究所, 广东广州 510640

摘要: 花生(*Arachis hypogaea* L.)是典型“地上开花、地下结果”的作物,为从转录后调控水平解析此独特的果实发育现象,本文应用 small RNA 测序技术研究荚果发育 11 个时期果壳及种子中的 microRNA 及其靶基因。通过测序分别获得 212 个已知的 microRNA 和 112 个新 microRNA,其中,已知 microRNA 包括 197 个保守 microRNA 和 15 个花生特异 microRNA,新 microRNA 来自 62 个新的 microRNA 前体序列。表达分析发现,67 个 microRNA 及其靶基因在荚果发育的 11 个时期存在时空特异性表达,部分 microRNA 的表达量积累阶段性调节果壳与种子的发育,表明 microRNA 参与了花生荚果暗发育的整个过程。此外,对 28 个 microRNA 与 30 个靶基因进行荧光定量 PCR 验证发现, microRNA 和靶基因的表达趋势与测序结果基本一致。本研究通过对花生荚果不同发育时期的果壳和种子进行 small RNA 测序,鉴定参与调控花生荚果膨大相关的 microRNA,为研究黑暗条件下植物果实发育的调控机制与花生遗传改良奠定理论基础。

关键词: 花生; 荚果发育; small RNA 测序; microRNA; 靶基因

Identification and expression analysis of microRNA during peanut (*Arachis hypogaea* L.) pod development

HU Dong-Xiu**, LIU Hao**, HONG Yan-Bin, LIANG Xuan-Qiang, and CHEN Xiao-Ping*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / South China Peanut Sub-Center of National Center of Oilseed Crops Improvement / Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: “Aerial flower and subterranean fruit” is a distinct feature in peanut (*Arachis hypogaea* L.). To dissect this character at post-transcription level, small RNA sequencing was performed to identify microRNAs in peanut pod shell and seed during eleven developmental stages. Sequencing analysis identified 212 known microRNAs, including 197 conserved and 15 specific microRNA. In addition, 112 novel microRNAs from 62 novel microRNA precursors were identified. Among the known and new microRNAs, 67 microRNAs and their target genes showed differentially expressed patterns during peanut pod development. Expression trend analysis revealed stage-specific and tissue-specific expression of microRNA and their target genes during pod shell and seed development, implying that microRNAs probably played a role in peanut pod development. To validate expression profiles from small RNA sequencing, quantitative real-time RT-PCR were performed using 28 microRNAs and 30 target genes, revealing consistent expression profiles with sequencing results. The data regarding microRNA and their target genes generated in this study would contribute to understanding the molecular mechanism of plant fruit development under darkness and to crop improvement.

Keywords: peanut; pod development; small RNA sequencing; microRNA; target gene

花生作为“地上开花、地下结果”的作物,其生殖发育过程与其他作物存在差异。花生开花受精后,

本研究由广东省重点研发计划项目(2020B020219003),国家自然科学基金项目(31771841)和广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010021)资助。

This study was supported by the Guangdong Provincial Major Research and Development Project (2020B020219003), the National Natural Science Foundation of China (31771841), and the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2020A1515010021).

* 通信作者(Corresponding author): 陈小平, E-mail: chenxiaoping@gdaas.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 胡冬秀, E-mail: HuDX1017@163.com; 刘浩, E-mail: liuhao@gdaas.cn

Received (收稿日期): 2020-07-02; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-11-18.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201118.1557.006.html>

子房柄伸长并向地生长形成果针, 位于其顶端的受精卵随着果针的伸长被推入土壤中, 果针停止伸长, 胚胎发育在黑暗条件下重新启动, 最终膨大形成荚果。花生荚果发育是一个复杂的生物学过程, 不同水平的调控对花生荚果种子发育均至关重要。研究 microRNA 如何调控黑暗条件下花生种子发育, 对理解植物果实暗发育调控与作物遗传改良具有重要意义。

microRNA 是一类内源性非编码小分子 RNA, 在植物中通常由 18~24 个核苷酸组成, 通过靶向降解或翻译抑制在转录后水平调控基因的表达^[1]。植物中非编码的 microRNA 基因, 在 NOT2 和 CDC5 等转录因子的作用下通过 RNA 聚合酶 II 转录生成具有茎环结构的初级转录物 Pri-microRNA (Primary microRNA)。随后 Pri-microRNA 经 DCL1、HY1 和 SE 组成的切割复合体剪切产生前体 pre-microRNA (microRNA 前体)^[2], pre-microRNA 经 DCL1 与 DCL4 进一步剪切生成成熟的 microRNA^[3], 在甲基转移酶 HEN1 的作用下使其 3'端发生 2'-O-甲基化来增强其稳定性^[4-5]。microRNA 在转运蛋白 HST 作用下从细胞核进入细胞质中, 随后与 AGO 效应蛋白 (argonaute proteins, AGOs) 结合形成 RNA 介导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complexes, RISCs) 中, 结合互补的靶向基因信使 RNA 后使其被剪切降解^[6]。microRNA 作为一种重要的转录后调控因子, 参与植物的生长发育、信号转导、胁迫响应、器官分化以及病原菌调控等多种生物学过程^[7-14]。拟南芥中, FUL 蛋白与 ARF (auxin response factor) 相互作用并结合到 miR172 前体序列的启动子区域, 通过抑制 miR172 下游靶基因 *AP2* 与 *TOE3* 表达进而促进果实发育^[15]; 人为干预 miR319 的表达活性则导致拟南芥花瓣变短、雄蕊败育、种子缺失等现象^[16]。单子叶植物中, 水稻 OsIDD2 与 SLR1 相互作用, 通过赤霉素途径调控 miR396 介导的细胞增殖过程^[17]; 而 OsmiR408 剪切 OsUCL8 编码序列会影响细胞中的铜离子稳态、质体蓝素丰度与水稻光合效率, 从而增加穗部分枝和粒数^[18]。花生受到黄曲霉侵染时, 种子通过降低 ayh-miRNA160、ayh-miRNA164 对抗病基因 TIR-NBS-LRR 表达量产生的负调控效应, 从而提高抗病蛋白的表达量以抵御黄曲霉污染^[19]。花生子房柄中的 ayh-miR160a、ayh-miR171n 与 ayh-miR156e 通过调控其靶基因参与激素信号转导途径, 在花生荚果、种子膨大阶段起关键作用^[20]。

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是我国重要的油料与经济作物, 荚果暗发育是花生最显著的特征之一, 已有相关研究报道非编码小 RNA 参与了花生胚胎与荚果早期的发育^[21-22], 但对其荚果种子发育的整个过程缺乏全面的了解, 尤其对 microRNA 方面的相关研究仍然较为欠缺。本研究以‘粤油 7 号’为试验材料, 对其荚果发育不同时期的材料进行 small RNA 测序, 并利用 qRT-PCR 技术验证测序的结果, 鉴定和筛选出花生荚果种子发育过程中相关的 microRNA 及其在花生荚果种子发育过程中的表达模式。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花生品种粤油 7 号种植于广东省农业科学院白云基地。对粤油 7 号植株的自交花进行鉴定并用彩色线标记, 在花后第 8 天用彩色标签系好伸长的果针。花生果针入土前, 被标记为第 1 个时期, 命名为 P0 (Pod 0); 荚果开始膨大后通过测量荚果与种子的直径大小, 将整个荚果发育划分为 10 个时期, 即 P1~P10 (Pod1~Pod10), 其中果壳与种子分开取样。果壳样品以缩写 SH (Shell) 表示, 种子样本以缩写 SD (Seed) 表示。本研究共对 11 个时期, 包括 1 个地上 (果针即将入土) 和 10 个地下发育阶段 (图 1-A), 以开花后天数作为参考, 荚果与种子直径为主要指标来划分生育期, 最后获得 20 份样品。

1.2 RNA 的提取及 small RNA 测序

利用 TRIzol (Invitrogen) 法提取 20 个样品的总 RNA, 使用 NanoDrop (Thermo Scientific) 和安捷伦 2100 生物分析仪 (安捷伦) 对每个样品的 RNA 质量进行评估分析; 利用 Illumina small RNA-seq 文库构建试剂盒制备 small RNA 测序文库, 利用 Illumina HiSeq 2000 平台产生原始测序数据。

1.3 small RNA 测序结果分析

利用 Fastx-Tool kit, 对 small RNA 序列的原始数据进行过滤筛选, 去除接头序列、低质量序列, 包括冗余碱基或未被识别的碱基冗余序列, 以及小于 18 nt 的序列。将过滤后的数据利用 Rfam 11.0 数据库和 GenBank 非编码 RNA 数据库去除 t/r/sn/snoRNA 以及带有 polyA 尾巴的 RNA, 对其他的 small RNA 序列利用 microRNA19.0 数据库进行 BLASTn 搜索, 以检索花生中已知的 microRNA。此外, 利用 Bowtie 将 small RNA 序列映射到 GenBank

中的 AHGI v2.0 和花生 GSS 中进行比对, 完全匹配的序列将用于进一步分析。如果接近完全匹配的序列小于检索的 small RNA 或已知 small RNA 的长度, 则人工挑选检查与比较不匹配部分, 以确定匹配核苷酸的数量。为了有效识别花生中潜在的 microRNA 前体序列和新的 microRNA, 用 miREAP 预测软件分析 microRNA 前体序列, 利用 MiPred 对由此产生的茎环结构进行过滤, 剩余的 pre-microRNA 的二级发夹结构使用 CentroidFold 软件进行评估。

1.4 花生荚果发育过程中 microRNA 趋势分析

microRNA 测序数据以 RPKM (reads per kilo-base per million mapped reads) 值表示, 将表达量数据归一化分析。差异表达的 microRNA 以 RPKM > 10 为筛选标准, 以此数据为基础利用 TBtools 软件绘制表达热图, 利用 STEM 软件对花生荚果发育过程中的 microRNA 和靶基因进行趋势分析, 并获得显著性和非显著性表达模式, 其中 $P < 0.05$ 的定义为显著表达模式。

1.5 茎环 RT-PCR 荧光定量检测 microRNA

取 5 μg 总 RNA 加入 DNase I 去除基因组 DNA 污染, 利用 TaKaRa SMART Scribe Reverse Transcriptase 反转录酶对 microRNA 进行反转录。取 2 μg 的总 RNA 样品中加入终浓度为 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 microRNA 的茎环引物, 将混合物在 72 $^{\circ}\text{C}$ 预热 3 min 后置于冰上冷却使 RNA 变性, 打开二级结构。随后加 5 $\times$ First Strand Buffer、dNTP Mix、20 mmol L^{-1} DTT、0.15 μL RRI (recombinant RNase inhibitor, 40 U μL^{-1})。加入 1 mL (100 U μL^{-1}) SMART Scribe RT

再次混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 反应结束后 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 或加入 4 μL 50 mmol L^{-1} EDTA 终止反应。荧光定量 PCR 方法参照试剂 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 说明书, 上述反转的 cDNA 样品浓度稀释为 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ 。荧光定量 PCR 的反应体系为 20 μL , 包含 10 μL SYBR Green Master Mix、2 μL 模板、特异性正向引物和通用反向引物各 0.4 μL 、0.4 μL ROX Reference Dye I、6.8 μL 的 ddH₂O。ABI Step OnePlus 仪器检测, 循环反应为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环; *U6* 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 microRNA 表达水平的相对定量, 每个样品设置 3 次生物学重复。

1.6 Quantative real time-PCR 检测靶基因表达量

利用 Prime Script RT 试剂盒 (TaKaRa, 中国大连) 将 1 μg 总 RNA 反向转录为 cDNA, 反应体系为 20 μL , 采用 ABI Step One Plus 系统, 使用 SYBR Premix ExTaq (TaKaRa, 中国大连) 进行 PCR 反应, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目标基因各组织的相对表达量, 以 P0 作为对照样品。18S rRNA 作为内参基因, 每个样品设置 3 个重复, 数据用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 花生荚果种子发育的表型特征

花生开花受精后, 子房柄不断伸长形成果针 (P0)。随着果针的伸长, 位于其顶端的受精胚珠进入土壤中, 当果针刚进入地下时 (P1), 其直径并未发生变化 (图 1-B)。在黑暗条件下, 果针停止伸长, 顶

图1 花生荚果发育的表型特征

Fig. 1 Phenotype characteristics of pod development in peanut

A: 试验样品信息; B: 花生荚果种子发育的表型特征。P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

A: summary of experimental samples; B: phenotype characteristics of peanut pod (shell and seed) development. P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

端迅速膨大形成荚果(P2~P6)。通过测量直径,果壳在 P6 时期的直径大小是 P2 时期的 5~6 倍,但是 P6 阶段过后,果壳基本不再继续膨大,因此进入土壤后的第 6 个时期是果壳发育逐渐停止的时期。种子发育在 P2~P6 阶段生长缓慢,在 P6 期果壳不再发育之后,种子则以较快的速度开始充实,其直径从 P6 到最后的成熟期,至少增大了 3 倍以上。表明,果壳早于种子开始发育,果壳的提前膨大为后续种子生长提供了空间和能量,两者间发育的时间差有利于能量物质有效地供应种子生长。

2.2 花生荚果发育过程中 small RNA 分析

对花生果壳和种子发育的 20 个样品进行 small RNA 测序,共获得 282,960,633 个 reads,每个文库的 reads 数量从 7,049,655 到 17,761,513。对接头序列和短序列进行修剪后,共得到 206,940,419 个序列(图 2-B),长度大于 17 nt。其中长度在 18~30 nt 的有 177,581,859 条,有 38,699,203 条为花生中的特异

small RNA。

microRNA 属于微小的非编码 RNA,在转录后水平的基因调控中具有重要作用。为全面了解荚果发育过程中 microRNA 的全基因组信息,从花生荚果种子发育过程中鉴定了长度为 18~30 nt 的 small RNA 序列(图 2-A),在 21 个和 24 个核苷酸处观察到了花生地下荚果种子发育(P1~P10)的 2 个主要高峰。果壳文库(P2SH~P10SH)有 2 个接近的高峰,而种子文库(P2SD~P10SD)则以 24 个核苷酸 small RNA 为主。值得注意的是,气生荚果 P0 中 19 个核苷酸处出现 1 个额外的高峰,进一步分析发现,这 19 个核苷酸序列中的大多数来自于几个高度表达的 microRNA。此外,在最初的地下荚果 P1 中,总的 small RNA 在 27~30 个核苷酸之间高度表达,但 24 个核苷酸 small RNA 在所有样本中均占优势,在种子和果壳的总 small RNA 中分别占 74%和 72%,表明花生的 small RNA 是类型复杂且多样的非编码 RNA。

图 2 花生荚果 small RNA 测序结果的分析

Fig. 2 Results of small RNAs sequencing analysis in peanut pod

A: 全部以及特异性 small RNA 的长度分布和频率; B: small RNA 统计分析; C: small RNA 的分类。P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

A: length distribution and frequency of total and unique small RNAs; B: summary statistics of small RNAs; C: the categories of peanut small RNAs. P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

2.3 花生荚果发育过程中 small RNA 的鉴定

为进一步鉴定花生中保守的和新的特异性 microRNA, 我们通过图 3 所示的策略分析 small RNA。对接头和短序列进行过滤后, 共得到 38,699,203 条花生的特异 small RNA, 随后去除 t/r/sn/snoRNA 共 15,326,397 条, 其中 rRNA 的数量最多, 其次是 tRNA、snRNA 和 snoRNA 数量相对较少(图 2-C)。得到 38,326,363 条候选的 small RNA, 鉴定到 212 个已知的 microRNA, 包括 39 个 microRNA 家族的 197 个保守的 microRNA 和 13 个 microRNA 家族的 15 个特异 microRNA (附表 1)。经过逐步筛选, 本研究还获得 62 个新的 microRNA 二级前体结构以及其对应生成的 112 个新的成熟 microRNA。将前体命名为 ahy-MIR-s (1~62)。利用 RNAfold 在线软件 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 预测其二级结构(图 4), 所有前体都能形成茎环结构, 多数前体形成 4~6 个茎环, 此外, ahy-MIR-s23、ahy-MIR-s31 和 ahy-MIR-s57 等 3

个前体形成了 3 个茎环, ahy-MIR-s2、ahy-MIR-s36 和 ahy-MIR-s56 3 个前体有 7 个茎环, ahy-MIR-s45 和 ahy-MIR-s20 分别形成 1 个和 8 个茎环。进一步研究发现, 112 个新的成熟 microRNA (表 1) 定位于 62 个新的 Pre-miRNA 的 3' 臂或 5' 臂, 并将其命名为 ahy-miR-s(1-62)-3/5P, 大小为 19~24 nt, 其中 ahy-miR-s8-3p 为 19 nt, ahy-miR-s3-5p、ahy-miR-s7-5p 和 ahy-miR-s29-5p 等 7 个 microRNA 为 20 nt, ahy-miR-s1-3p、ahy-miR-s2-3p 和 ahy-miR-s3-3p 等 40 个 microRNA 为 21 nt, 序列长度为 22 nt 和 23 nt 的 microRNA 分别为 12 个和 6 个, ahy-miR-s6-5p、ahy-miR-s15-5p 和 ahy-miR-s16-3p 等 46 个 microRNA 长度为 24 nt。

2.4 花生荚果发育过程中 microRNA 的表达分析

对 RPKM 大于 10 的 microRNA 进行表达分析发现, 在花生荚果 11 个发育阶段共有 67 个 microRNA 差异表达。利用 TBtools 软件^[23]进行聚类分析和绘制热图(图 5)发现, microRNA 在荚果发育过程动态

图3 microRNA 分析流程

Fig. 3 Pipeline of microRNA data analysis

图 4 新的 Pre-microRNA 二级结构分析

Fig. 4 Secondary structure of new Pre-microRNAs in peanut

表达, 且呈时期特异性。在种子中 microRNA 的表达可分为 K1、K2 和 K3 三个簇, K1 簇中 microRNA 在种子发育中表达相对较低。在 K2 簇中 microRNA 在种子成熟期(P7~P10)高表达。例如, ahy-miR166e、ahy-miR-s21-5p 和 ahy-miR-s26-5p 在 P8 具有较高的表达量, 而 ahy-miR-s1-3p、ahy-miR319c、ahy-miR-s29-5p 和 ahy-miR-s53-5p 等 4 个 microRNA 在 P10 表达显著高于其他时期; ahy-miR166h-3p、ahy-miR168a 和 ahy-miR-s12-5p 等 microRNA 在 P8~P10 都呈现了较高的表达。K3 簇中 microRNA 主要在 P5~P7 中表达, 其中 ahy-miR319i、ahy-miR390a-5p 和 ahy-miR-s31-5p 等 3 个 microRNA 在种子初期(P2)有较高表达。ahy-miR167-3p、ahy-miR-s36-5p 和 ahy-miR-s10-5p 等 3 个 microRNA 在 P4~P6 均有较高表达。在种子发育过程中 P3 时期 microRNA 的表达都相对较低。microRNA 在果壳中

的表达, 聚类将其分为了 5 个簇, C1 簇中 microRNA 在果壳 P8~P10 高度表达, 例如, ahy-miR319c、ahy-miR156b-5p 和 ahy-miR167e 分别在 P10、P9 和 P8 时期高丰度表达。C2 簇主要在果壳发育初期(P2)高丰度表达, C3 簇中 microRNA 呈现阶段性表达, 主要在 P5~P9 期有较高的表达量, 例如 ahy-miR167c 在 P7~P9 均表达较高。C4 簇中 microRNA 在果壳中呈现低表达, C5 簇主要在 P3 呈现高表达。表达分析结果进一步表明, microRNA 在果壳和种子中都以高度阶段性或时期特异性的方式表达。

花生荚果发育过程中 microRNA 的趋势分析结果显示, 花生荚果发育中的 microRNA 共分为 10 种表达模式(图 6-A), 大约 84% 的 microRNA 聚类到两种模式, 其中有 43 个 microRNA 聚类为 profile.9 表达模式(图 6-B), 13 个 microRNA 聚类为 profile.8 表达模式, 说明花生荚果发育过程中多数 microRNA

图5 microRNA 在花生荚果发育过程中的表达模式分析

Fig. 5 Expression profile analysis of microRNAs in peanut pod (shell and seed) development

P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

归入上述 2 个显著表达模式。microRNA 在花生荚果发育过程中的表达是动态的, 在 profile.9 表达模式中, 花生荚果发育初期(P2~P5 期)中 microRNA 的表达在种子中呈现下调, 在果壳中表达也较低, 随后 microRNA 表达上调, 种子和果壳发育中期(P6~P7 期) microRNA 表达达到最高, 花生荚果发育后期 microRNA 表达下调。在 profile.8 表达模式中, 花生荚果发育过程中 microRNA 的表达均处于上调, 在种子发育 P4 和 P7 期表达最高, 而在果壳中 P9 期表达最高。在其他几个表达模式中, microRNA 在花生荚果发育的不同时期的积累水平也存在一定的差异。

2.5 花生荚果发育过程中靶基因的表达分析

microRNA 在转录后水平调控其下游靶基因来发挥生物学功能, 对 67 个 microRNA 的靶基因进行预测分析, 按照错配数 5 进行筛选, 共得到 552 个靶基因, 其中 ahy-miR482e 的靶基因数目最多(32 个), ahy-miR-s51-3p 和 ahy-miR-s58-5p 的靶基因数

目最少(仅 1 个)。大多数保守的 microRNA 的靶基因是 MYB、ARF 和 BEL1-like 等转录因子, 其他 microRNA 的靶基因包括 NB-LRR 型抗病蛋白、F-box/FBD/LRR 重复蛋白和锌指蛋白等, 此外还有部分未知功能的靶基因。为了进一步了解所预测靶基因的可能功能, 对其进行表达模式分析, 如图 7 所示, 其靶基因在花生果壳和种子发育过程中也呈现了高度阶段性和特异性的表达方式。例如, *AHTC20003756* 为 BEL1-like 转录因子, 在种子的 P6 期高丰度表达, 而 *AHTC20115371* 和 *AHTC20081975* 分别在果壳的 P4 和 P3 期高丰度表达。*AHTC20054506* 编码了 NB-LRR 抗病蛋白, 在种子中表达量较高, 而在果壳中几乎不表达。*AHTC20001034* 介导丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)途径, 在荚果发育的后期, 即种子和果壳的 P7~P10 期均有较高的表达。值得注意的是, *AHTC20010002* 在荚果发育的整个过程中均高丰度表达, 但对其功能有待研究。

图 6 花生荚果发育过程中 microRNA 的趋势分析

Fig. 6 Trend analysis of microRNAs during peanut pod (shell and seed) development

P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

对花生荚果发育过程中靶基因表达趋势进行分析表明, 花生荚果发育过程中靶基因共有 20 个表达模式(图 8)。其中有 profile.7、profile.11、profile.18 和 profile.19 等 4 个显著表达模式, 在 profile.7 表达模式中, 基因在种子 P6~P9 中高丰度表达, 在种子成熟期基因表达逐渐下调, 而在果壳中表达相对较低。在 profile.11 表达模式中, 基因在种子和果壳的发育早期表达最高。在 profile.18 中基因在荚果发育的过程中均处于上调表达, 在种子 P3 和 P6 以及果壳的 P9 时期表达量最高。在 profile.19 中, 种子发育

早期基因表达量较低, 在 P6 时期基因上调表达, 而在果壳发育早期基因表达量较高, P8 期开始下调表达。

2.6 RT-PCR 实时定量验证

为了验证测序结果数据的准确性, 选取 28 个 microRNA 和 30 个靶基因分别进行茎环 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测发现, microRNA 和靶基因的表达趋势与测序分析结果基本一致(图 9)。例如, 在 microRNA 中(图 9-A), ahy-miR-s29-5p 和 ahy-miR166d 分别在种子 P10 和果壳 P3 高丰度表达; ahy-miR2118a 在果壳中高丰度表达, 而在种子中表

图7 靶基因在花生荚果发育过程中的表达模式分析

Fig. 7 Expression profile analysis of target genes in peanut pod (shell and seed) development

P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

达相对较低; *ahy-miR156e* 在种子发育过程中从 P3 时期开始有表达, P7 时期表达量最高, 随后逐渐降低, 而在果壳中几乎不表达。在靶基因表达中(图 9-B), *AHTC20084751* 编码的 *AUX1* 蛋白基因在果壳 P10 时期的表达显著高于其他时期, *AHTC20067917* 为 GATA 转录因子, 在种子的 P8 时期高表达, *AHTC20022021* 为乙醇酸氧化酶基因, 该基因在种子 P7~P9 时期均高丰度表达, 呈现阶段性的表达方式。总体而言, 荧光定量检测结果表明, microRNA 及其靶基因的表达量与测序结果基本一致, 该结果为后续深入分析、克隆 microRNA 及其靶基因调控花生荚果发育奠定了基础。

3 讨论

为了解花生荚果发育过程的表型特征, 对花生荚果的 1 个地上发育时期和 10 个地下发育时期的研究发现, 果针向地生长过程中(即 P0~P1 时期)不断伸长但其直径几乎不变, 果针入土后停止生长, 胚

胎恢复发育, 荚果迅速膨大, 即 P2~P6 时期是荚果体积的快速增长阶段, 而种子的发育相对滞后, 即在这一时期生长相对缓慢。在 P6 时期后荚果大小基本不变, 种子则进入快速生长阶段。因此, P6 时期既是荚果停止膨胀的分界点, 也是种子进入快速发育阶段的分界点。

本研究获得了 62 个新的 Pre-microRNA 和 112 个新的成熟的 microRNA, 对 Pre-microRNA 进行二级结构预测发现, 所有前体均具有典型的茎环结构, 且多数序列(A+U)含量高于(G+C)含量, 说明鉴定得到的 microRNA 前体结构较稳定。成熟的 microRNA 在茎环结构的 3'臂或 5'臂上, 并能检测到其表达。此外, 对 microRNA 进行表达模式分析表明, microRNA 在荚果发育过程中的表达是动态的, 且呈现阶段性和特异性表达。例如, *ahy-miR390a-5p* 在种子 P2 时期表达较高, 在甘蓝型油菜中, *miR390* 通过调控靶基因的表达介导早期胚胎发育, 从而影响其种子的含油量, 推测 *ahy-miR390a-5p* 可能参与花生荚果发育早期胚胎的发育^[24]。*ahy-miR156d* 和

图 8 花生荚果发育过程中靶基因的表达趋势分析

Fig. 8 Expression trend analysis of target genes during peanut pod (shell and seed) development

P0: 地上果针; P2-P5: 果实膨大期; P6-P9: 果实充实期; P9-P10: 成熟期。

P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2-P5: pod expansion stage; P6-P9: seed filling stage; P9-P10: mature stage.

图9 转录组数据的 qRT-PCR 验证

Fig. 9 RT-qPCR validation of transcriptome data

P0: 地上果针; P1: 地下果针; P2~P5: 果壳膨大期; P6~P9: 果实充实期; P9~P10: 成熟期。

P0: aerial peg; P1: subterranean peg; P2~P5: pod expansion stage; P6~P9: seed filling stage; P9~P10: mature stage.

ahy-miR156e 在花生种子成熟期(P7~P9)的表达显著高于其他时期, 相关研究表明, miR156 通过靶向 *SPL10* 和 *SPL11* 基因, 能够导致不正常的细胞分裂^[25], 从而控制种子的发育^[26-27]。ahy-miR397a 在 P0 期高度表达, 在水稻中, miR397 的过表达通过靶向 L-抗坏血酸氧化酶(AO)^[28], 抑制抗坏血酸(AA)的氧化, 从而使脱氢抗坏血酸(DHA)维持在较低水平, 进而促进细胞分裂^[29]。而种子在早期发育阶段需要具备很高的细胞分裂能力, 推测 ahy-miR397a 可能通过抗氧化途径而调控花生种子的发育过程。ahy-miR167e 在种子 P4~P7 时期表达显著高于其他时期, ahy-miR167-5p 在种子发育过程中均高表达, 在拟南芥和水稻中, miR167 通过调控靶基因 *ARF6* 和 *ARF8* 的表达参与种子的发育^[30-31], 因此 ahy-miR167 可能在花生荚果发育过程中发挥重要作用。microRNA319 家族(ahy-miR319a、ahy-miR319b、ahy-miR319e 和 ahy-miR319f)在 P0 时期高度表达, miR319 在花生荚果发育过程中参与生长素和 GA 信号传导途径, 能够促进花生胚胎和荚果早期发育^[22]。

4 结论

花生荚果种子发育过程中, microRNA 以时空特异的方式表达, 表明不同的 microRNA 在花生荚果、种子发育的不同时期发挥作用, 该结果为阐释花生荚果暗发育的分子机制提供了转录后调控的理论参考依据。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.china-crops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuwx-b.aspx>。

References

- [1] Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 2013, 25: 2383–2399.
- [2] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303: 2022–2025.
- [3] Dong Z, Han M H, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 9970–9975.

- [4] Yu B, Yang Z Y, Li J J, Minakhina S, Yang M C, Padgett R W, Steward R, Chen X M. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, 307: 932–935.
- [5] Park W, Li J J, Song R T, Messing J, Chen X M. CARPEL FACTORY, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12: 1484–1495.
- [6] Xie M, Zhang S X, Yu B. microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 87–99.
- [7] 邢利娟, 刘悦萍, 王磊, 徐妙云. miRNA 参与植物胚和胚乳发育调控的研究进展. *生物技术进展*, 2020, 10(2): 109–116.
Xing L J, Liu Y P, Wang L, Xu M Y. Research progress of miRNA involved in regulation of plant embryo and endosperm development. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(2): 109–116 (in Chinese with English abstract).
- [8] 秦耀旭, 张关元, 刘司奇, 刘洋, 许志茹. 植物重金属胁迫相关 miRNA 的研究进展. *分子植物育种*, 2019, 17: 2855–2861.
Qin Y X, Zhang G Y, Liu S Q, Liu Y, Xu Z R. Research progress of miRNA related to heavy metal stress in plants. *Mol Plant Breed*, 2019, 17: 2855–2861 (in Chinese with English abstract).
- [9] 郁佳雯, 韩荣鹏, 仇婷, 李宗芸, 潘沈元, 董婷婷. microRNA 在植物生长发育中的研究进展. *分子植物育种*, 2020, 18: 1496–1504.
Yu J W, Han R P, Qiu T, Li Z Y, Pan S Y, Dong T T. Research progress on microRNA in plant growth and development. *Mol Plant Breed*, 2020, 18: 1496–1504 (in Chinese with English abstract).
- [10] Long R C, Li M N, Li X, Gao Y L, Zhang T J, Sun Y, Kang J M, Wang T H, Cong L L, Yang Q C. A novel miRNA sponge form efficiently inhibits the activity of miR393 and enhances the salt tolerance and ABA insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep*, 2017, 35: 409–415.
- [11] 李科学, 曲德杰, 黄慧梅, 曹金山, 樊仔慧, 李国纪, 王幼宁. miRNA 调控大豆根系结瘤及共生固氮的分子机制研究进展. *植物生理学报*, 2019, 55: 1587–1594.
Li K X, Qu D J, Huang H M, Cao J S, Fan Z H, Li G J, Wang Y N. Research progress on miRNA-mediated molecular mechanisms of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in soybean. *J Plant Physiol*, 2019, 55: 1587–1594 (in Chinese with English abstract).
- [12] Wang T Y, Ping X K, Cao Y R, Jian H J, Gao Y M, Wang J, Tan Y C, Xu X F, Lu K, Li J N, Liu L Z. Genome-wide exploration and characterization of miR172/euAP2 genes in *Brassica napus* L. for likely role in flower organ development. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 336.
- [13] Jiao X M, Wang H C, Yan J J, Kong X Y, Liu Y W, Chu J F, Chen X Y, Fang R X, Yan Y S. Promotion of BR biosynthesis by miR444 is required for ammonium-triggered inhibition of root growth. *Plant Physiol*, 2020, 182: 1454–1466.
- [14] Guo G H, Liu X Y, Sun F L, Cao J, Huo N, Wuda B, Xin M M, Hu Z R, Du J K, Xia R, Rossi V, Peng H R, Ni Z F, Sun Q X, Yao Y Y. Wheat miR9678 affects seed germination by generating phased siRNAs and modulating abscisic acid/gibberellin signaling. *Plant Cell*, 2018, 30: 796–814.
- [15] José Ripoll J, Bailey L J, Mai Q A, Wu S L, Hon C T, Chapman E J, Ditta G S, Estelle M, Yanofsky M F. microRNA regulation of fruit growth. *Nat Plants*, 2015, 1: 15036.
- [16] Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001031.
- [17] Lu Y Z, Feng Z, Meng Y L, Bian L Y, Xie H, Mysore K S, Liang J S. SLENDER RICE1 and *Oryza sativa* INDETERMINATE DOMAIN2 regulating osmiR396 are involved in stem elongation. *Plant Physiol*, 2020, 182: 2213–2227.
- [18] Zhang J P, Yu Y, Feng Y Z, Zhou Y F, Zhang F, Yang Y W, Lei M Q, Zhang Y C, Chen Y Q. MiR408 regulates grain yield and photosynthesis via a phytoecyanin protein. *Plant Physiol*, 2017, 175: 1175–1185.
- [19] Zhao C, Li T, Zhao Y, Zhang B, Li A, Zhao S, Hou L, Xia H, Fan S, Qiu J, Li P, Zhang Y, Guo B, Wang X. Integrated small RNA and mRNA expression profiles reveal miRNAs and their target genes in response to *Aspergillus flavus* growth in peanut seeds. *BMC Plant Biol*, 2020, 20: 215.
- [20] Ma X L, Zhang X G, Zhao K K, Li F P, Li K, Ning L L, He J L, Xin Z Y, Yin D M. Small RNA and degradome deep sequencing reveals the roles of microRNAs in seed expansion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Front Plant Sci*, 2018, 9: 349.
- [21] Chen H, Yang Q, Chen K, Zhao S S, Zhang C, Pan R L, Cai T C, Deng Y, Wang X J, Chen Y T, Chu W T, Xie W P, Zhuang W J. Integrated microRNA and transcriptome profiling reveals a miRNA-mediated regulatory network of embryo abortion under calcium deficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Genomics*, 2019, 20: 392.
- [22] Gao C, Wang P F, Zhao S Z, Zhao C Z, Xia H, Hou L, Ju Z, Zhang Y, Li C S, Wang X J. Small RNA profiling and degradome analysis reveal regulation of microRNA in peanut embryogenesis and early pod development. *BMC Genomics*, 2017, 18: 220.
- [23] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y H, Xia R. Tbttools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, S1674-2052: 30187–30188.
- [24] Zhao Y T, Wang M, Fu S X, Yang W C, Qi C K, Wang, X J. Small RNA profiling in two *Brassica napus* cultivars identifies microRNAs with oil production-and development-correlated expression and new small RNA classes. *Plant Physiol*, 2012, 158: 813–823.
- [25] Nodine M D, Bartel D P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev*, 2010, 24: 2678–2692.
- [26] Palatnik J F, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington J C, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 2003, 425: 257–263.
- [27] Wang S K, Wu K, Yuan Q B, Liu X Y, Liu Z B, Lin X Y, Zeng R Z, Zhu H T, Dong G J, Qian Q, Zhang G Q, Fu X D. Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nat Genet*, 2012, 44: 950–954.

- [28] Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster S J, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer C H. Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol*, 2006, 141: 423–435.
- [29] Potters G, Horemans N, Caubergs R J, Asard H. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiol*, 2000, 124: 17–20.
- [30] Yang J H, Han S J, Yoon E K, Lee W S. Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 1892–1899.
- [31] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress induced miRNA. *Mol Cell*, 2004, 14: 787–799.