园艺学报，2019，46 (5)：864－876.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0924；http：//www. ahs. ac. cn

黄瓜 *microRNA171* 的克隆与功能分析

朱早兵，虞夏清*，翟于菲，王盼乔，赵勤政，李　季，娄群峰，陈劲枫*
（南京农业大学园艺学院，作物遗传与种质创新国家重点实验室，南京 210095）

摘　要：为了解 *microRNA171*（*miR171*）对黄瓜的调控作用，从华北型黄瓜‘北京截头’中克隆了 *Csa-miR171* 家族的 4 个 miRNA 前体序列 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d*，对前体序列进行比对与进化分析，预测成熟序列的靶基因并进一步开展了拟南芥遗传转化功能研究。结果表明，4 个前体共剪切出两种成熟序列 *Csa-miR171a* 和 *Csa-miR171b*，系统进化显示，*Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 分别与甜瓜 *Cme-miR171e*、*Cme-miR171c*、*Cme-miR171a*、*Cme-miR171b* 同源性最近，与拟南芥、水稻、番茄等较远；*Csa-miR171a*、*Csa-miR171b* 成熟序列主要靶向 GRAS 转录因子蛋白家族基因，拟南芥中过表达 *Csa-miR171a* 前体改变了叶片形态、颜色、抽薹时间、根、果实、花器官形态等多个表型性状。

关键词：黄瓜；*microRNA171*；克隆；靶基因预测；转基因
中图分类号：S 642.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0513-353X（2019）05-0864-13

Cloning and Functional Analysis of *microRNA171* in Cucumber

ZHU Zaobing，YU Xiaqing*，ZHAI Yufei，WANG Panqiao，ZHAO Qinzheng，LI Ji，LOU Qunfeng，and CHEN Jinfeng*
（*College of Horticulture，Nanjing Agricultural University，National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement，Nanjing* 210095，*China*）

Abstract：To investigate the function of *microRNA171*（*miR171*）in cucumber，four precursors *Csa-miR171a*，*Csa-miR171b*，*Csa-miR171c*，*Csa-miR171d* of *Csa-miR171* family genes were cloned in the northern Chinese cucumber‘Beijingjietou’and followed by sequence alignment and phylogenetic analysis. Target genes of the mature sequence of *Csa-miR171* were predicted and functional analysis was performed in *Arabidopsis* by genetic transformation. The results showed that the two mature sequences，*Csa-miR171a* and *Csa-miR171b* were cleaved from the four *Csa-miR171* precursors. Phylogenetic analysis showed that *Csa-miR171a*，*Csa-miR171b*，*Csa-miR171c*，*Csa-miR171d* were closer to *Cme-miR171e*，*Cme-miR171c*，*Cme-miR171a*，*Cme-miR171b* in melon than those in *Arabidopsis*，rice and tomato，etc. GRAS transcription factor family was predicted to be the main target gene of *Csa-miR171*. Overexpression of *Csa-miR171a* in *Arabidopsis* significantly affected the phenotypes including leaf morphology and leaf color，blooming time，root，fruit and floral morphology.

Keywords：cucumber；*microRNA171*；clone；target gene prediction；transgenic

收稿日期：2018－11－12；**修回日期：**2019－01－03
基金项目：国家自然科学基金重点项目（31430075）；江苏省基础研究计划（自然科学基金）青年基金项目（BK20180536）；中国博士后科学基金面上项目（2017M611834）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：jfchen@njau.edu.cn，xqyu@njau.edu.cn）

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

microRNA（miRNA）是一类长度为 18 ~ 25 bp 的非编码小分子 RNA，主要以离散的转录单位分布在真核生物的基因间区域（Axtell & Bartel，2005；Millar & Waterhouse，2005）。真核生物基因组中的 miRNAs 经 RNA 聚合酶Ⅱ（Pol-Ⅱ）转录为初级产物 pri-miRNA，pri-miRNA 由 Drosha /DCL1（Dicer-Like1）酶加工成 pre-miRNA，然后剪切形成 miRNA：miRNA*复合物，最后形成成熟的 miRNAs 组装进入 RNA 诱导沉默复合体（RISC）参与基因转录后调控（Bartel，2004；Jonesrhoades & Bartel，2004；Millar & Waterhouse，2005；Zamore & Haley，2005）。已证实 miRNAs 参与植物多方面的功能，如种子萌发（龚淑敏 等，2015）、生长发育（Bolle et al.，2000；Sabatini et al.，2003；Jonesrhoades & Bartel，2004）、激素信号转导（Rhoades et al.，2002；Fu et al.，2015）、营养代谢（Lauressergues et al.，2012）以及胁迫响应（Axtell & Bartel，2005；Yang et al.，2011）等。

miR171 又名 *miR39*，是最早发现的 miRNAs 家族成员之一。拟南芥中存在 3 个 *miR171* 同源序列 *At-miR171a*、*At-miR171b* 和 *At-miR171c*，主要靶向 GRAS 转录因子蛋白家族（Llave et al.，2002a，2002b）。研究表明，拟南芥 *miR171* 通过靶向 GRAS 家族基因 *Scarecrow-Like*（*SCL*）调控拟南芥的分枝性和叶绿素生物合成（Wang et al.，2010；Ma et al.，2014）；水稻 *miR171* 通过剪切 GRAS 家族基因 *OsHAM* 促进营养生长向生殖生长过渡以及根尖分生组织稳态形成（Fan et al.，2015）；番茄 *miR171* 通过靶向 *HAIRY MERISTEM*（*HAM*），维持了芽和花序分生组织的稳定（Hendelman et al.，2016）。另外，大麦 *miR171* 过表达能够激活 *miR156* 对其下游靶基因表达抑制，导致植物营养生长向生殖生长转变（Curaba et al.，2013）。尽管 *miR171-GRAS* 调控模型在多个模式作物中已有较为深入的研究，但目前在黄瓜中 *miR171* 的鉴定以及功能研究尚不清楚。因此，以黄瓜 *miR171* 为切入点，在已完成 miRNAs 测序的‘北京截头’黄瓜中克隆了 4 个 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 前体，通过序列比对、进化分析，成熟的 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b* 靶基因预测，确定了黄瓜 *Csa-miR171* 成熟序列的保守区域以及物种相对进化关系，构建了 *Csa-miR171a*：*pGreen0029-GFP* 过表达载体，实现拟南芥功能转化，为进一步研究黄瓜 *Csa-miR171* 的调控功能提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

黄瓜（*Cucumis sativus* L.）栽培品种‘北京截头’种子催芽处理后播种于穴盘（10 cm × 10 cm）中，在 REN-560E-4 型人工气候箱（宁波东南仪器有限公司）中培养，温度 28 ℃/25 ℃（昼/夜），光周期为 14 h/10 h（昼/夜），相对湿度为 70%。哥伦比亚野生型拟南芥，种植于人工气候箱，培养条件 22 ℃/20 ℃（昼/夜），光周期 18 h/6 h（昼/夜），相对湿度 65% ~ 70%。

过表达载体为 *pGreen0029-GFP* 双元表达载体，切胶回收采用 OMEGA 公司胶回收试剂盒（Gel Extration Ket），质粒回收采用 OMEGA 公司质粒小提试剂盒（Plasmid Mini Kit Ⅰ），转化用农杆菌为 C_{58} 型根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens* C_{58}），使用 *Sma* Ⅰ限制性内切酶和 T_4-DNA 连接酶。

1.2　总 DNA、RNA 提取与反转录

黄瓜、拟南芥总 DNA 提取采用 CTAB 法（Murray & Thompson，1980；Doyle & Dolye，1987）。拟南芥总 RNA 提取采用 Trizol 法，反转录采用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒（PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser）。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.3 黄瓜 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c* 和 *Csa-miR171d* 前体克隆与序列分析

根据前期‘北京截头’叶片非编码小 RNAs 测序结果，筛选获得 4 个高表达、高质量的 *Csa-miR171* 成熟序列和前体序列，将筛选到的 *Csa-miR171* 前体序列比对到黄瓜基因组数据库（http：//cucurbitgenomics.org/），获得具有高效表达的 *Csa-miR171* 前体侧翼序列（*Csa-miR171* 前体序列上、下游各延伸 100～150 bp），采用 primer 6 软件进行引物设计（表 1），以黄瓜 DNA 为模板进行 PCR 扩增，得到 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 完整的 4 个前体序列。将 *Csa-miR171* 前体的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接，转 DH5*α* 感受态细胞，采用氨苄青霉素（AMP）抗性筛选阳性菌落，PCR 鉴定阳性克隆送至公司（南京擎科生物科技有限公司）测序鉴定。

表 1 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 克隆引物列表

Table 1 The primers for cloning *Csa-miR171a*，*Csa-miR171b*，*Csa-miR171c*，*Csa-miR171d*

miRNA	正向引物序列（5′－3′） Forward primer sequence	反向引物序列（5′－3′） Reverse primer sequence
Csa-miR171a	TGTGAAGTAGTAGATGGAGT	GTAGCAAAGTCTATGCAGTTC
Csa-miR171b	CGTTCAACCACTTCTGTCTGTCT	ACGTCAATCGTCGATATTGGCAC
Csa-miR171c	CCTCTGCGTTTCTGCTGTT	GGTCGTGTACCCTTTCTGATAT
Csa-miR171d	ACAAGCACGAGTATAGAAGGAG	AAGGGAAAGGTGATATGAGGTT

采用 Clustalx 2.0 软件，以黄瓜 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 前体序列为模板进行序列比对，采用 Genedoc 3.2 软件分析比对结果。系统进化分析采用 MEGA 7.0 软件，邻接法（Neighbor-joining，NJ）构建系统进化树，Bootstrap 重复为 1 000（Felsenstein，1985；Saitou & Nei，1987；Kumar et al.，2016）。

1.4 黄瓜 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b* 成熟序列的靶基因预测

将黄瓜中克隆到的两个 *Csa-miR171a* 和 *Csa-miR171b* 成熟序列提交到 miRNA 靶基因预测网站 psRNATarget（http：//plantgrn.noble.org/psRNATarget/），靶基因搜索物种为 *Cucumis sativus*，期望值 ≤ 5，将预测到的靶基因比对到黄瓜基因组序列注释信息数据库（http：//cucurbitgenomics.org/），确定其功能。

1.5 黄瓜 *Csa-miR171a* 植物过表达载体构建与农杆菌转化

采用质粒 DNA 提取试剂盒提取克隆测序正确的 *Csa-miR171a* 前体阳性菌液 DNA 质粒，以 DNA 质粒为模板进行第 2 次 PCR 扩增，电泳鉴定，切胶回收，目的片段磷酸化。采用 *Sma* Ⅰ酶切 *pGreen0029-GFP* 质粒，去磷酸化，将酶切后的质粒电泳检测确认酶切成功，T_4-DNA 连接酶连接获得重组质粒。将重组质粒转化大肠杆菌（DH5*α*），卡那霉素（Kan）抗性筛选，挑单个菌落，以 *pGreen0029-GFP* 载体序列为正向引物 F：5′-CGGAGAGGTACGTATTTTTAC-3′，基因序列为反向引物 R：5′-GTAGCAAAGTCTATGCAGTTC-3′进行 PCR 扩增。鉴定为阳性的重组质粒转化根癌农杆菌 C_{58}，通过四环素（Tet）、利福平（Rif）、庆大霉素（Gend）、卡那霉素（Kan）抗性筛选与菌液 PCR 鉴定，加菌液∶油∶水 = 1∶1∶1 混合均匀，液氮速冻，－80 ℃保存备用。

1.6 农杆菌介导 *Csa-miR171a* 浸花法转化拟南芥与转化植株筛选

将重组表达载体的农杆菌菌液 28 ℃，220 r · min^{-1} 振荡 12 h 活化扩大培养，6 000 r · min^{-1} 离心 5 min，加入 5%的蔗糖重悬菌液至 OD_{600} = 0.8～1.0，加 100 μL 拟南芥转化辅助剂 Silwet-77 制备侵染液。将拟南芥未开放的花序浸没在侵染液中，轻轻晃动 10～15 s。浸染后的拟南芥遮光并转移至

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

湿度和温度较高的人工气候箱培养 1 d，之后恢复正常培养。每周侵染 2 次，侵染 2 周。待拟南芥果荚成熟后收获 T_0 代种子，干燥处理，4 ℃保存备用。

T_0 代种子消毒后种在 1/2 MS（100 mg · L^{-1}）卡那抗性固体平板上，筛选出生长正常的阳性幼苗。将阳性苗移栽至花盆（10 cm × 10 cm）中，待其生长至抽薹，提取叶片 DNA。以 *Csa-miR171a* 克隆正向引物：5′-TGTGAAGTAGTAGATGGAGT-3′，反向引物：5′-GTAGCAAAGTCTATGCAGTTC-3′进行 PCR 验证。筛选出转化单株，移栽至人工气候箱正常生长，每个株系单独收获种子（T_1 代）。采用相同的方法获得 T_2 代转基因纯合种子，干燥处理后 4 ℃保存。

将 Kan 抗性筛选的 T_2 代幼苗移栽于穴盘中，待真叶完全展开后，分别提取野生型和过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥株系 DNA，以 *Csa-miR171a* 克隆的正、反向引物进行 PCR 扩增，重组质粒 *Csa-miR171a*：*pGreen0029-GFP*（CK）为阳性对照鉴定转基因拟南芥植株。

1.7 *Csa-miR171a* 转基因拟南芥表型测定与相关基因表达的 qRT-PCR 分析

分别选取 5 株，每株取第 3 片完全展开叶，用游标卡尺测量植株叶长、叶宽。植株抽薹后第 10 天统计野生型和转基因拟南芥总分枝（主枝和侧枝）数量。采用 Dualex 4（FORCE-A，Orsay，France）无损叶绿素测定仪测定转基因拟南芥叶绿素的含量。分别取 3 株，每株取第 3 片完全展开叶进行正反两面测定（Goulas et al.，2004；Cerovic et al.，2012）。光系统Ⅱ（PS Ⅱ）最大光化学量子产量 F_v/F_m 值定采用便携式叶绿素荧光仪（Mini PAM，WALZ Germany），测定之前叶片暗适应 30 min。

分别提取野生型和转基因拟南芥叶片 RNA，纯化后采用 Mir-X miRNA first-strand synthesis Kit 反转录试剂盒反转录成 cDNA（Djami-Tchatchout & Dubery，2015）。*Csa-miR171a* 定量采用末端加尾法，采用 *Csa-miR171a* 特异性成熟序列为正向引物：5′-TGATTGAGCCGCGCCAATATC-3′与 mRQ3′通用反向引物（试剂盒提供），内参采用 U6（试剂盒提供）。*Csa-miR171a* 靶基因在拟南芥中的同源基因 *At4G00150.1*（*At-SCL6-Ⅳ*）与 GA/AUX 激素相关基因定量内参采用 *AT-actin 1*，引物如表 2 所示。

定量仪器采用 Bio-Rad CFX96。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行处理（Livak & Schmittgen，2001）。差异显著性分析采用 SPSS 软件，Duncan's 新复极差法。

表 2　*At-SCL6-Ⅳ*，GA/AUX 激素转导相关基因定量引物

Table 2　The primers of GA/AUX hormone transduction related gene and *At-SCL6-Ⅳ*

基因名称 Gene name	正向引物序列（5′－3′） Forward primer sequence	反向引物序列（5′－3′） Reverse primer sequence
AT-actin 1	GTCTGGATTGGAGGGTC	TGAGAAATGGTCGGAAA
GID1C	CCGAGATTGGTATTGGAGAGC	GGTATGGAAGTGATTGTTGTTAGG
GID1B	AATCTACCAACCTGCGTCTCT	CGTTCCATCCATCGTCGTAAG
SLY1	ACAAGAAGATGAAGAGTACAGAGG	GCAGCCGATGTTAGTCCAG
GA1	AATGAAGAAGACGACGGTAACG	TTAGACGACGGAGGATTAAGGT
RGL1	AAGCCAAGACCGAGTGATGT	ATTGATTCGCCACGCAGATG
RGA	TTGTAATCTGGTGGCTTGTGAA	TGGTAATGAGTGGACGAGTGT
RGL2	TCAGATTCGCTTCAACAGTTAGG	GTGGTTCGCTTCTTGCTCAA
ATRGL3	GTTGTGGTGGTGGTGGAGA	TCATCGTCGTCTGTGATTGGT
ATPIF4	TGGAGTTATTATGGCGAGATGGA	GAGGTTCAGGACTGGACTTAGG
LAX2	AGGTTCTTGATGGATTGCTTGG	CTGTAGTTGTGGAAGGAAGGAATA
AUX1	AAGGAGTAGAAGCGATAGTAGCA	AGAACAGAGATGAGATAAGCAGTC
LAX1	AAGCGGAGGAGTCAATAGTAGT	GCAGCGTCAACAGCACTT
TIR1	GCGACGGTGATTAGGAGGTT	GCGATAGCAGCGAGACCAT
AUX/IAA-like	GATGGCTTCATTGTCTTGTGTTG	AGGAACTTGTGTTGTTGCTGAT
ARF1	GGCAGACACTCCTTCCTCAG	CGACAGCACCAGACACAGA
ETT	CTTCTGTGTCTGTGGTGTCTTC	TGTAGTCGTCTCTGCGTGAA
NPH4	TGCCTGACACGCTACTCTC	GCCACAATCCACCACCAAG
At-SCL6-Ⅳ	CACCTTCCACGACTCTGACTA	CTCTATGACCTCTGCTGCCTTA

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c* 和 *Csa-miR171d* 前体克隆、序列比对与进化分析

以黄瓜 DNA 为模板，分别克隆得到黄瓜 4 个 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 前体序列。序列比对结果（图 1，A）表明，4 个前体序列差异较大区域集中在发夹区，共剪切出两种不同的成熟序列：*Csa-miR171a*（5′-UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC-3′）和 *Csa-miR171b*

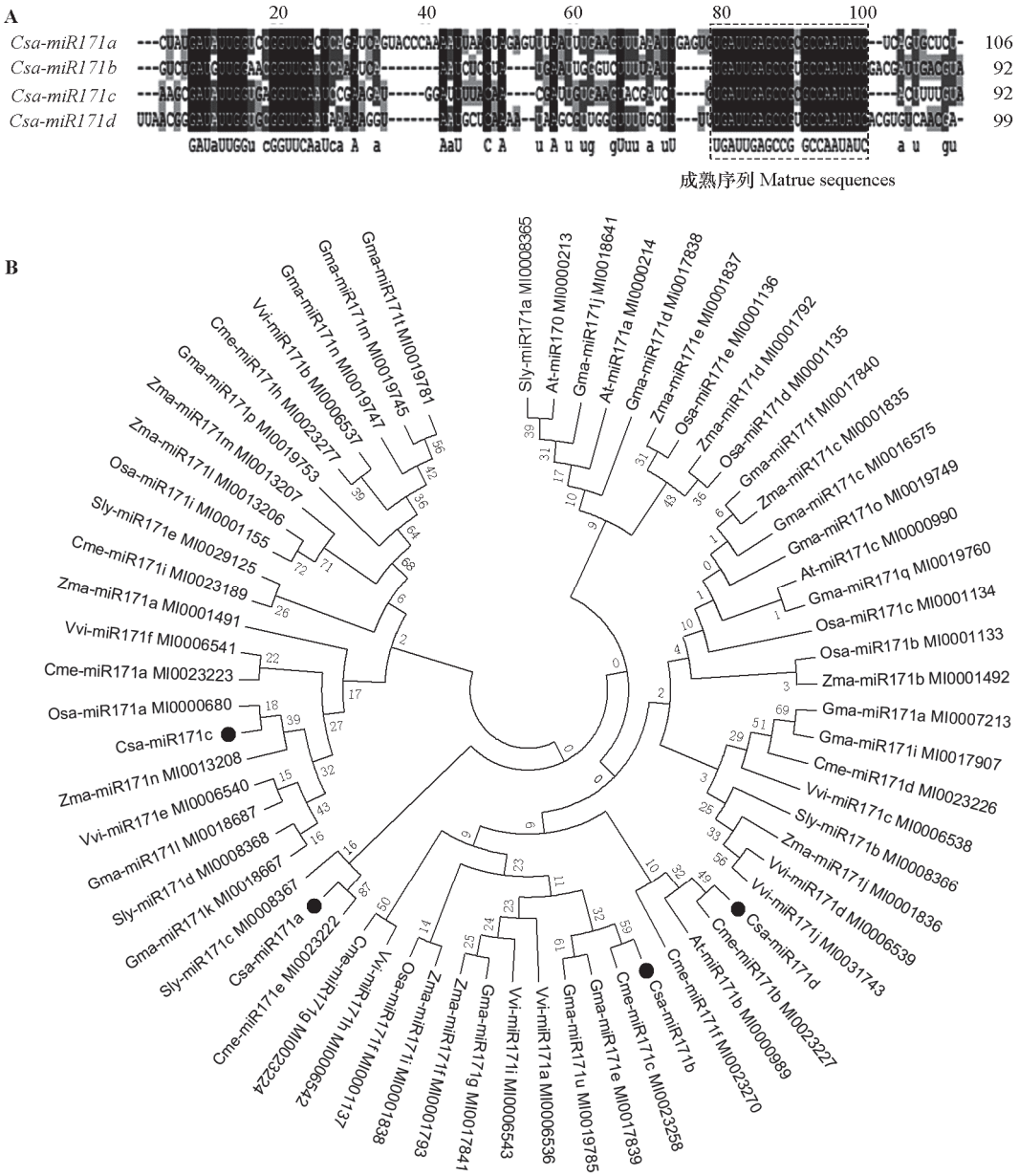


图 1 黄瓜 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 前体序列比对（A）和进化分析（B）

At：拟南芥；Cme：甜瓜；Osa：水稻；Gma：大豆；Vvi：葡萄；Zma：玉米；Sly：番茄。

Fig. 1 Sequence alignment（A）and evolution analysis（B）of *Csa-miR171a*，*Csa-miR171b*，*Csa-miR171c*，*Csa-miR171d*

At：*Arabidopsis thaliana*；Cme：*Cucumis melo*；Osa：*Oryza sativa*；Gma：*Glycine max*；Vvi：*Vitis vinifera* L.；Zma：*Zea mays*；Sly：*Solanum lycopersicum*.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（5′-UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC-3′）。*Csa-miR171b* 成熟序列的第 12 个碱基由 C 替换成了 U。*Csa-miR171c* 和 *Csa-miR171d* 前体剪切出的成熟序列与 *Csa-miR171a* 和 *Csa-miR171b* 成熟序列相同。为了进一步探究 4 个前体序列的进化关系，从 miRdabase 数据库（http：//www.mirbase.org/）中下载拟南芥、甜瓜、水稻、大豆、葡萄、玉米、番茄等 7 种模式作物的 *miR171* 前体序列，与 *Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 前体序列构建系统进化树，结果（图 1，B）表明，*Csa-miR171a*、*Csa-miR171b*、*Csa-miR171c*、*Csa-miR171d* 与甜瓜 *Cme-miR171e*、*Cme-miR171c*、*Cme-miR171a*、*Cme-miR171b* 进化关系最近，与拟南芥、水稻等的 *miR171* 前体进化关系较远。

2.2　黄瓜 *Csa-miR171a* 和 *Csa-miR171b* 成熟序列靶基因预测

如表 3 所示，黄瓜 *miR171a* 和 *miR171b* 两个成熟序列的预测靶基因为 Scarecrow（SCR）GRAS 转录因子家族、ABC_1 蛋白以及山梨醇转运蛋白等家族，其中 *Csa-miR171* 与黄瓜 GRAS 转录因子家族匹配程度最高。

表 3　黄瓜 *Csa-miR171a/b* 靶基因预测

Table 3　Prediction of *Csa-miR171a/b* target genes in cucumber

miRNA	靶蛋白 Target protein	靶基因 ID（期望值） Target gene ID（expected value）
Csa-miR171a	Scarecrow（SCR）GRAS 转录因子家族蛋白 Scarecrow（SCR）GRAS transcription factor family protein	*Csa6G109640.1*（0），*Csa3G020600.1*（0） *Csa4G04840.1*（2），*Csa4G043830.1*（3）
	山梨醇转运蛋白 Sorbitol transporter	*Csa5G292260.1*（4.5）
	核糖体蛋白 S_{19}/S_{15} Ribosomal protein S_{19}/S_{15}	*Csa3G143520.1*（4.5）
	糖转运蛋白 Sugar transporter	*Csa2G245410.1*（4.5）
	Yippee 家族蛋白 Yippee family protein	*Csa4G308560.1*（4.5）
	ABC_1 家族蛋白家族 ABC_1 family protein	*Csa7G209020.1*（4.5）
	α/β 折叠水解酶家族蛋白 Alpha/Beta fold hydrolase family	*Csa2G373470.1*（4.5）
	β 糖基水解酶 Beta-fructofuranosidase 5	*Csa2G351670.1*（4.5）
	磷脂酶 A-2 活化蛋白 Phospholipase A-2-activating protein	*Csa7G075650.1*（5）
	类 DNA 解旋酶 DNA helicase-like	*Csa5G172850.1*（5）
Csa-miR171b	Scarecrow（SCR）GRAS 转录因子家族蛋白 Scarecrow（SCR）GRAS transcription factor family protein	*Csa6G109640.1*（0.5），*Csa3G020600.1*（0.5） *Csa4G043840.1*（1），*Csa4G043830.1*（2）
	COBRA 蛋白 COBRA protein	*Csa3G078790.1*（3.5）
	ABC 转录家族蛋白 ABC transporter family protein	*Csa5G292220.1*（3.5），*Csa5G611710.1*（4），*Csa7G209020.1*（5）
	锌指蛋白 Membrane-associated zinc metalloprotease family	*Csa2G417840.1*（4），*Csa7G450560.1*（4.5）
	葡聚糖酶超家族 Glucanases superfamily	*Csa2G439150.1*（4.5）
	$PLAC_8$ 样蛋白 $PLAC_8$-like protein	*Csa4G047880.1*（4.5）
	GPN 环 GTP 酶 GPN-loop GTPase	*Csa4G642570.1*（4.5）
	小 GTP 酶超家族 Small GTPase superfamily	*Csa1G172570.1*（5）
	山梨醇转运蛋白 Putative sorbitol transporter	*Csa5G292260.1*（5）
	核糖体蛋白 S_{19}/S_{15} Ribosomal protein S_{19}/S_{15}	*Csa3G143520.2*（5），*Csa3G143520.1*（5）
	乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	*Csa3G207920.1*（5）
	糖转运蛋白 Sugar transporter	*Csa2G245410.1*（5）
	Yippee 家族蛋白 Yippee family protein	*Csa4G308560.1*（5）

注：期望值是成熟小 RNA 与靶序列之间错配评估值，数值越高表示相似性越小。

Note：Expectation value is the penalty for the mismatches between mature small RNA and the target sequence，a higher value indicates less similarity between small RNA and the target candidate.

为进一步确定 *Csa-miR171* 靶基因的位点，从黄瓜基因组数据库中下载 GRAS 转录因子家族基因 *Csa6G109640.1* 序列，通过拟南芥基因组数据库（https：//www.arabidopsis.org/）BLAST 序列比对，获得黄瓜 *Csa6G109640.1* 基因在拟南芥中的同源基因 *At4G00150.1*（拟南芥 GRAS 家族基因 *At-SCL6-Ⅳ*），分别与 *Csa-miR171a* 成熟序列进行比对分析。结果（图 2）表明 *Csa6G109640.1* 基

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

因 5′端 1 226 ~ 1 247 bp 处与 *Csa-miR171a* 成熟序列完全匹配，*At4G00150.1* 基因 5′端 675 ~ 696 bp 处与 *Csa-miR171a* 成熟序列完全匹配。

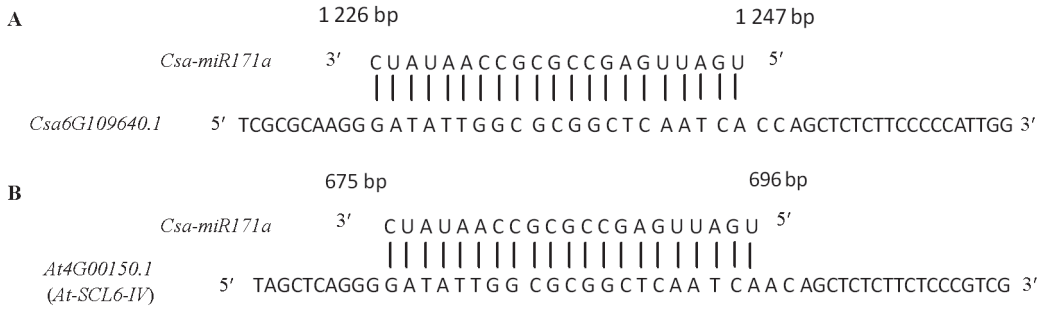


图 2　黄瓜 *Csa-miR171a* 与靶基因 *Csa6G109640.1*（A），*At4G00150.1*（B）序列比对

Fig. 2　Sequence alignment of cucumber *Csa-miR171a* with the target gene *Csa6G109640.1*（A）and *At4G00150.1*（B）

2.3　转 *Csa-miR171a* 基因拟南芥植株的鉴定

通过 Kan 抗性筛选获得转基因阳性拟南芥植株，其生长正常，叶片呈绿色（图 3，A、B）。PCR 鉴定结果表明，过表达 *Csa-miR171a* 的拟南芥中株系扩增出的 *Csa-miR171* 片段（*Csa-miR171a* 前体侧翼序列 282 bp）与重组质粒（阳性对照）相同，野生型拟南芥并未扩增出条带（图 3，C），表明 *Csa-miR171a*：*pGreen0029-GFP* 重组质粒成功插入拟南芥基因组中。



图 3　过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥株系抗性筛选与 PCR 验证

M：Marker 1000；WT：野生型拟南芥；T：转化植株；P：重组质粒。

Fig. 3　PCR validation of *OE-Csa-miR171a* in *Arabidopsis thaliana*

M：Marker1000；WT：Wild-type；T：Transformed plant；P：Plasmid.

2.4　*Csa-miR171a* 和 *At4G00150.1* 在转基因拟南芥中的表达分析

序列比对表明，*Csa-miR171a* 成熟序列与 *At-miR171a* 成熟序列高度保守（图 4，A），5′、3′以及发夹区的差异较大。采用荧光定量 PCR 对转基因株系 *Csa-miR171a* 成熟序列及其预测靶基因在拟南

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

芥中的同源基因 *At4G00150.1*（*At-SCL6-Ⅳ*）进行了表达量分析。结果（图 4，B）表明，*Csa-miR171a* 在转基因拟南芥叶片中表达量显著高于野生型，*At4G00150.1*（*At-SCL6-Ⅳ*）在转基因拟南芥中呈显著下调表达。

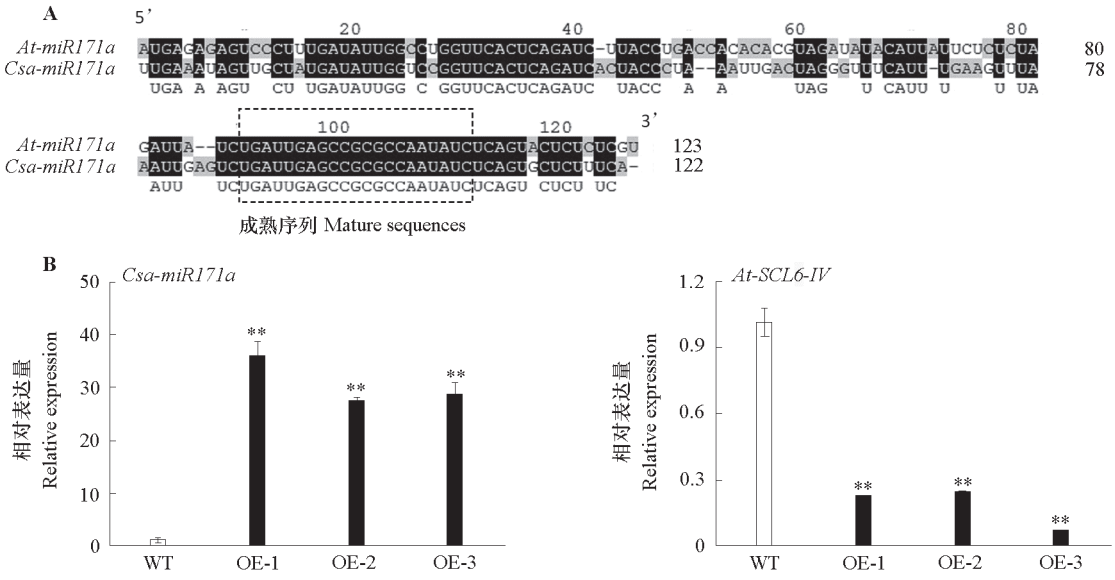


图 4　*Csa-miR171a* 与 *At-miR171a* 前体序列比对（A）与转基因拟南芥中基因的表达分析（B）

** 表明在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

Fig. 4　Sequence alignment（A）of *Csa-miR171a* and *At-miR171a* precursors and expression analysis（B）of *At-SCL6-Ⅳ* in transgenic *Arabidopsis thaliana*

** indicates differences that are extremely statistically significant on the $P < 0.01$ level.

2.5　拟南芥中过表达 *Csa-miR171a* 影响多个表型性状

对过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥与野生型拟南芥进行表型观察与统计。结果（表 4，图 5）显示，过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥与野生型拟南芥相比，整体株形变得稀疏，叶间距增加，主枝明显，抽薹时间提前；果荚、花器官增大，叶片窄长，叶脉明显，叶色明显加深，叶绿素含量极显著增加。此外，过表达 *Csa-miR171a* 导致拟南芥主根变短，侧根数量增多，分枝明显减少；同时，光合量子效率（F_v/F_m）显著增加，种子的形态无显著变化。

表 4　过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥表型统计

Table 4　Phenotype analyses of *OE-Csa-miR171a Arabidopsis thaliana*

材料 Material	叶宽/mm Leaf width	叶长/mm Leaf length	分枝数量 Branch	总叶绿素含量/（μg · cm^{-2}） Chl	F_v/F_m
野生型 Wild type	15.81 ± 0.32*	48.83 ± 1.44	16.33 ± 1.04**	14.39 ± 1.81	0.800 ± 0.003
过表达 *OE-Csa-miR171a*	13.36 ± 0.19	46.42 ± 0.51	1.17 ± 0.41	27.38 ± 1.53**	0.820 ± 0.001*

注：* 表明在 $P < 0.05$ 水平差异显著，** 表明在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

Note：* indicates differences that are statistically significant on the $P < 0.05$；** indicates differences that are extremely statistically significant on the $P < 0.01$ level.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

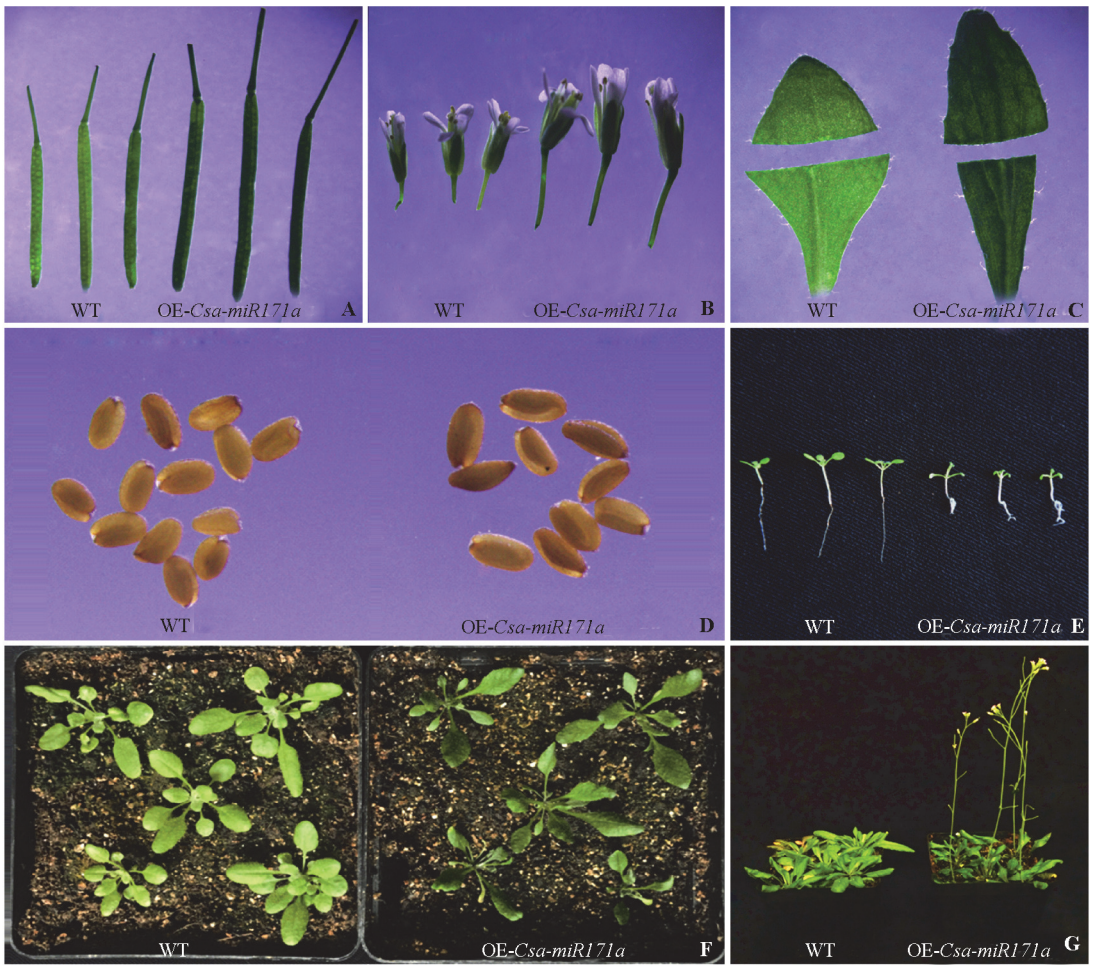


图 5　过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥与野生型（WT）植株表型差异

A：果荚；B：花器官；C：叶片；D：种子；E：根；F：叶色；G：分枝。

Fig. 5　Phenotypic divergences between *OE-Csa-miR171a Arabidopsis thaliana* and wild type

A：Fruit pod；B：Floral organ；C：Leaf；D：Seed；E：Root；F：Leaf color；G：Branch.

2.6　拟南芥中过表达 *Csa-miR171a* 影响叶片赤霉素、生长素转导相关基因的表达

植物生长发育与激素密切相关，从 kegg 数据库（https：//www.kegg.jp/）植物激素通路（ko04075）中，筛选了 8 个赤霉素调控相关基因（*GID1C*、*GID1B*、*SLY1*、*GAI*、*RGL1*、*RGA*、*RGL2* 和 *ATRGL3*）以及 9 个生长素调控相关基因（*ATPIF4*、*LAX2*、*AUX1*、*LAX1*、*TIR1*、*AUX/IAA-like*、*ARF1*、*ETT* 和 *NPH4*）。对拟南芥野生型和过表达株系叶片进行了 GA 和 AUX 相关基因定量分析，结果（图 6）表明，在过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥株系中，GA 和 AUX 相应相关的基因多数呈现显著下调表达。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

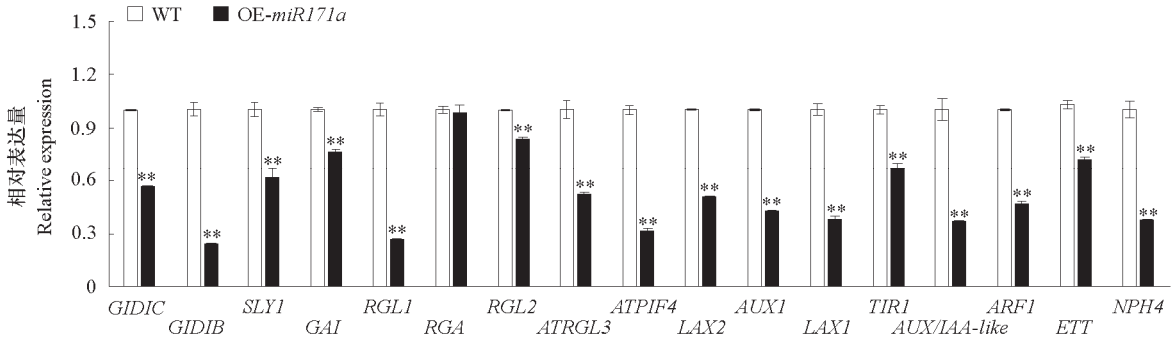


图 6　GA 和 AUX 转导相关基因定量

** 表明在 $P < 0.01$ 水平存在显著性差异。

Fig. 6　qRT-PCR of GA and AUX hormone transduction related genes in *OE-Csa-miR171a* plants

** indicates differences that are extremely statistically significant on the $P < 0.01$ level.

3　讨论

3.1　*miR171* 在物种中的分布与进化保守性

miRNA 在不同物种之间具有较高的保守性，且不同物种之间保守程度不同（Arteagavázquez et al.，2006；Zhang et al.，2006）。通常认为编号从 *miRNA156* 到 *miRNA408* 的 miRNAs 保守程度较高，*miRNA408* 以后的 miRNAs 被认为是物种进化过程中新形成的，这些新形成的 miRNAs 具有种属特异性，与特殊条件诱导有关（Ma & Axtell，2010；Tang，2010；魏强 等，2013）。研究表明，高度保守的 miRNAs 家族在植物生长发育以及胁迫响应等方面都起着重要的作用（王艳芳 等，2015a）。*miR171* 作为古老且保守程度较高的 miRNA 之一，在多个物种中已有广泛研究，目前，在 miRbase 数据库（http：//www.mirbase.org/index.shtml）中搜索 *miR171* 共获得 212 条结果，涵盖 42 种植物。其中 *miR171* 家族成员超过 10 个（含 10 个）的有大豆 *Glycine max*（17 个）、苹果 *Malus* × *domestica*（14 个）、玉米 *Zea mays*（11 个）、毛果杨 *Populus trichocarpa*（10）、木薯 *Manihot esculenta* Crantz（10 个）。魏强等（2013）对 13 个物种之间的 miRNA 保守性进行研究发现，*miR171* 在 11 个物种中是保守的。王艳芳等（2015a，2015b）研究发现，大部分 *miR171* 以单拷贝形式分散在不同的染色体上，只有少部分在同一染色体上，且不同物种间 *miR171* 的同源性与物种本身的亲缘关系并无显著相关性，并推测 *miR171* 可能存在特殊的进化过程。

Zhu 等（2015）通过对拟南芥、水稻、杨树（*Populus*）和葡萄的 *miR171* 系统进化分析发现，成熟的 *miR171* 序列在其直系同源序列间的保守性可达 80%，在 38 个 *miR171* 成熟序列中，有 21 个位点几乎完全一致，表明 *miR171* 靶标的发散可能是由于 *miR171* 结合位点的差异引起的。在本研究中，*Csa-miR171a/b/c/d* 这 4 个的成熟序列仅有 1 个碱基的差异，表明 *miR171* 成熟序列在黄瓜中的保守性较高，与同属甜瓜 *miR171* 进化关系最近，这与上述王艳芳等（2015b）的研究有所不同。

3.2　黄瓜 *Csa-miR171* 功能保守性和特异性

miRNA 的功能主要通过对其下游靶基因调控实现，黄瓜两个 *miR171a/b* 成熟序列靶基因预测均特异靶向 GRAS 转录因子家族，表明了 *Csa-miR171-GRAS* 模型在黄瓜物种的保守性。*miR171-GRAS*

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

调控模型在多个研究中被报道（Wang et al.，2010；Ma et al.，2014；Huang et al.，2016）。GRAS 是植物中功能广泛且重要的一类转录因子，长度约 400 ～ 800 个氨基酸，具有由 5 个高度保守基序列（*LHR1*、*VHIID*、*LRII*、*PFYRE*、*SAW*）组成的 C 端和功能 N 端。GRAS 主要分为 8 个亚家族 DELLA、LISCL、PATI、SHR、SCL3、SCR、LS 及 HAM（Tian et al.，2004），不同的亚家族之间功能各异，研究表明，DELLA 参与多种激素，如赤霉素（GA）、脱落酸（ABA）、乙烯（ET）、茉莉酸（JA）信号转导，进而参与调控植物的生长和发育等多个过程（Achard & Harberd，2003；Fu & Harberd，2003；Sun，2010；岳川 等，2012；Fu et al.，2015）。PATI 亚家族成员与植物光信号传导调控过程相关（Bolle et al.，2000）。Scarecrow（SCR）家族参与皮质和内皮层细胞的不对称分裂（Di et al.，1996）。拟南芥 *At-SCR* 被证明与胚形成模式以及后胚发育期间与周围初始细胞的干细胞状态维持有关（Sabatini et al.，2003）。LS 亚家族与植物叶腋分生组织形成有关（Schumacher et al.，1999），在拟南芥中，*At-LAS* 抑制植株生长，延缓叶片的衰老和开花时间，提高植物的耐旱能力（Yang et al.，2011）。HAM 亚家族在植物的顶端分生组织具有重要调控作用。*Ph-HAM* 能够维持矮牵牛（*Petunia hybrida* Vilm）茎尖分生组织的发育（Stuurman et al.，2002）。在本研究中，过表达 *Csa-miR171a* 拟南芥株系表现为抑制主根伸长、侧根数量增加、抽薹时间提前，与 Fan 等（2015）研究中报道的水稻 *Osa-miR171*c 介导 4 个 *OsHAM* 转录因子调控植物从营养生长过渡到生殖生长以及根尖分生组织稳态结果一致，表明了黄瓜 *Csa-miR171a* 在植物生长生殖、根尖分生组织稳态方面具有相似的功能。同时，过表达黄瓜 *Csa-miR171a* 显著影响拟南芥叶绿素积累，与拟南芥中过表达 *miR171* 靶向 *SCL* 转录因子间接调控植物叶绿素合成研究结果相同（Wang et al.，2010；Ma et al.，2014），推测黄瓜 *Csa-miR171a* 与拟南芥 *miR171* 在调控叶绿素合成过程中可能具有相同的机制。本研究中过表达 *Csa-miR171a* 影响拟南芥 GA/AUX 转导相关基因的表达水平，与 Huang 等（2016）报道的番茄 *miR171* 靶基因 *SlGRAS24* 过表达，介导赤霉素和生长素稳态从而影响番茄多种表型性状改变的结果一致。表明黄瓜 *Csa-miR171a* 可能通过调控下游靶基因参与 GA 和 AUX 的响应。此外，过表达 *Csa-miR171a* 导致拟南芥花和果实器官明显增大，在以往的研究中未见报道，这也表明黄瓜 *Csa-miR171* 可能具有特异的功能。

miR171 广泛存在于植物中，对植物的生长、发育起着重要的调控作用。本研究的结果表明黄瓜 *Csa-miR171* 成熟序列间具有较高的保守性且进化关系与同属甜瓜最近。*miR171* 预测候选靶基因为 GRAS 转录因子蛋白家族，推测黄瓜 *Csa-miR171a* 功能的多样化可能与 *miR171-GRAS* 调控模型密切相关（有待进一步的研究验证）。本研究中不仅证明了黄瓜 *Csa-miR171a* 在叶绿素合成、根尖分生组织稳态以及营养生长向生殖生长转变过程中功能的保守性，同时也发现黄瓜 *Csa-miR171a* 在植物花器官和果实发育中新的功能，为进一步探究黄瓜 *Csa-miR171a* 在调控花器官和果实发育方面的作用提供了重要的参考。

References

Achard P，Harberd N P. 2003. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. Plant Cell，15 (12)：2816－2825.

Arteagavázquez M，Caballeropérez J，Viellecalzada J P. 2006. A family of microRNAs present in plants and animals. Plant Cell，18 (12)：3355.

Axtell M J，Bartel D P. 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. Plant Cell，17 (6)：1658－1673.

Bartel D P. 2004. MicroRNAs. Genomics，biogenesis，mechanism，and function. Cell，116 (2)：281－297.

Bolle C，Koncz C，Chua N H. 2000. PAT1. A new member of the GRAS family is involved in phytochrome a signal transduction. Genes & Development，14 (10)：1269－1278.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Cerovic Z G，Masdoumier G，Ghozlen N B，Ghozlen N B. 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. Physiologia Plantarum，146 (3)：251.

Curaba J，Talbot M，Li Z，Helliwell C. 2013. Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. BMC Plant Biology，13 (1)：1－10.

Di Laurenzio L，Wysocka-Diller J，Malamy J E，Pysh L，Helariutta Y，Freshour G，Hahn M G，Feldmann K A，Benfey P N. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. Cell，86 (3)：423.

Djami-Tchatchou A T，Dubery I A. 2015. Lipopolysaccharide perception leads to dynamic alterations in the microtranscriptome of *Arabidopsis thaliana* cells and leaf tissues. Bmc Plant Biology，15 (1)：1－19.

Doyle J J，Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue. Phytochem Bull，19：11－15.

Fan T，Li X，Yang W，Xia K，Ouyang J，Zhang M. 2015. Rice osa-miR171c mediates phase change from vegetative to reproductive development and shoot apical meristem maintenance by repressing four *OsHAM* transcription factors. PLoS ONE，10 (5)：e0125833.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies：an approach using the bootstrap. Evolution，39 (4)：783－791.

Fu X，Gao X，Liu X. 2015. Integration of ethylene and gibberellin signaling//Wen C K. Ethylene in plants. Netherlands：Dordrecht：Springer.

Fu X，Harberd N P. 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. Nature，421 (6924)：740－743.

Gong Shu-min，Ding Yan-fei，Zhu Cheng. 2015. The role of miRNAs in plant seed development. Genetics，37 (6)：554－560. (in Chinese)
龚淑敏，丁艳菲，朱　诚. 2015. miRNA 在植物种子发育过程中的作用. 遗传，37 (6)：554－560.

Goulas Y，Cerovic Z G，Cartelat A，Moya I. 2004. Dualex：a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. Appl Opt，43 (23)：4488－4496.

Hendelman A，Kravchik M，Stav R，Frank W，Arazi T. 2016. Tomato HAIRY MERISTEM genes are involved in meristem maintenance and compound leaf morphogenesis. Journal of Experimental Botany，67 (21)：6187－6200.

Huang W，Peng S，Xian Z，Yang L. 2016. Overexpression of a tomato miR171 target gene *SlGRAS24* impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. Plant Biotechnology Journal，15 (4)：472.

Jonesrhoades M W，Bartel D P. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets，including a stress-induced miRNA. Molecular Cell，14 (6)：787－799.

Kumar S，Stecher G，Tamura K. 2016. MEGA7：molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology & Evolution，33 (7)：1870.

Lauressergues D，Delaux P M，Formey D，Lelandais-Briere C，Fort S，Cottaz S，Becard G，Niebel A，Roux C，Combier J P. 2012. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. Plant Journal，72 (3)：512－522.

Llave C，Kasschau K D，Rector M A，Carrington J C. 2002a. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell，14 (7)：1605－1619.

Llave C，Xie Z，Kasschau K D，Carrington J C. 2002b. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. Science，297 (5589)：2053－2056.

Livak K J，Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods，25 (4)：402－408.

Ma Z，Axtell M J. 2010. *Arabidopsis lyrata* small RNAs：transient MIRNA and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. Plant Cell，22 (4)：1090－1103.

Ma Z，Hu X，Cai W，Huang W，Zhou X，Luo Q，Yang H，Wang J，Huang J. 2014. *Arabidopsis* miR171-targeted scarecrow-like proteins bind to GT cis-elements and mediate gibberellin-regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions. PLoS Genetics，10 (8)：e1004519

Millar A A，Waterhouse P M. 2005. Plant and animal microRNAs：similarities and differences. Functional & Integrative Genomics，5 (3)：129－135.

Murray H G，Thompson W F. 1980. Rapid isolation of higher weight DNA. Nucleic Acides Research，8：4321.

Rhoades M W，Reinhart B J，Lim L P，Burge C B，Bartel B，Bartel D P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. Cell，110 (4)：513－520.

Sabatini S，Heidstra R，Wildwater M，Scheres B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Genes & Development，17 (3)：354－358.

Saitou N，Nei M. 1987. The neighbor-joining method：a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution，4 (4)：406－425.

Schumacher K，Schmitt T，Rossberg M，Schmitz G，Theres K. 1999. The Lateral suppressor（Ls）gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，96 (1)：290－295.

Stuurman J，Jäggi F，Kuhlemeier C. 2002. Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. Genes & Development，16 (17)：2213－2218.

Sun T P. 2010. Gibberellin-GID1-DELLA：a pivotal regulatory module for plant growth and development. Plant Physiology，154 (2)：567.

Tang G. 2010. Plant microRNAs：an insight into their gene structures and evolution. Seminars in Cell & Developmental Biology，21：782－789.

Tian C，Wan P，Sun S，Li J，Chen M. 2004. Genome-side analysis of the GRAS gene family in rice and arabidopsis. Plant Molecular Biology，54 (4)：519－532.

Wang L，Mai Y X，Zhang Y C，Qian L，Yang H Q. 2010. MicroRNA171c-targeted SCL6-II，SCL6-III，and SCL6-IV genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*. Molecular Plant，3 (5)：794－806.

Wang Yan-fang，Zhao Yan-hong，Zhang Ping，Zhou Rui-lian. 2015a. Analysis of the evolution and function of soybean miR-171 gene family. Plant Genetic Resources，16 (5)：1089－1092. (in Chinese)
王艳芳，赵彦宏，张 萍，周瑞莲. 2015a. 大豆 miR-171 基因家族的进化与功能分析. 植物遗传资源学报，16 (5)：1089－1092.

Wang Yan-fang，Zhou Rui-lian，Zhao Yan-hong. 2015b. Evolutionary analysis of miR-171 gene family and prediction of target genes. Life Science Research，19 (6)：479－483. (in Chinese)
王艳芳，周瑞莲，赵彦宏. 2015b. miR-171 基因家族进化分析及靶基因预测. 生命科学研究，19 (6)：479－483.

Wei Qiang，Liang Yong-hong，Li Guang-lin. 2013. Evolution of plant miRNAs. Hereditas，35 (3)：315－323. (in Chinese)
魏 强，梁永宏，李广林. 2013. 植物 miRNA 的进化. 遗传，35 (3)：315－323.

Yang M，Yang Q，Fu T，Zhou Y. 2011. Overexpression of the *Brassica napus* BnLAS gene in Arabidopsis affects plant development and increases drought tolerance. Plant Cell Reports，30 (3)：373－388.

Yue Chuan，Zeng Jian-ming，Cao Hong-li，Wang Xin-chao，Zhang Zhi-fang. 2012. Metabolism of gibberellin in higher plants and its signal transduction pathway. Journal of Plant Physiology，48 (2)：118－128. (in Chinese)
岳 川，曾建明，曹红利，王新超，章志芳. 2012. 高等植物赤霉素代谢及其信号转导通路. 植物生理学报，48 (2)：118－128.

Zamore P D，Haley B. 2005. Ribo-gnome：The big world of small rRNAs. Science，309 (5740)：1519－1524.

Zhang B，Pan X，Cannon C H，Cobb G P，Anderson T A. 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal，46 (2)：243－259.

Zhu X，Leng X，Sun X，Mu Q，Wang B，Li X，Wang C，Fang J. 2015. Discovery of conservation and diversification of genes by phylogenetic analysis based on global genomes. The Plant Genome，8 (2)：1－11.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net