

植物 miR172 及其靶基因调控开花与发育的研究进展

赵晓晖¹, 孔凡江¹, 刘宝辉^{1,2}

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/中国科学院大豆分子设计育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006)

摘要: 对于开花植物来说, 生长发育进程、花器官的形成以及适时的完成开花是植物生存与种族延续的基础。对 miR172 及其靶基因调控植物开花与生长发育的研究进行了综述, 以期更好地理解 miR172 及其靶基因在此过程中的作用机理, 对包括植物开花和发育转型在内的重要农艺性状的改良及分子设计育种奠定基础。

关键词: 植物 miR172; 开花期; 生长发育

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)02-0126-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.02.0126

MicroRNA(miRNA)是一类由 20~24 个核苷酸组成的内源非编码小分子 RNA, 不翻译产生功能蛋白, 通过与其靶基因互补配对, 在转录水平、转录后抑制或降解其靶基因, 是多细胞机体基因调控网络中的重要成员^[1-2]。植物 miRNA 与其靶基因几乎可以完全互补配对, 所以预测比较简单, 目前已经开发了很多在线预测数据库和预测软件, 使用起来都比较简单方便。预测出的靶基因尚需要进一步的实验来证实, 目前常用的方法有 5'-RACE 法^[3-4]、利用 Western-blot、荧光定量 PCR 或荧光素酶报告基因法^[5]等。

植物 miRNA 具有多种功能, 参与生长素信号传导与代谢、开花时间调控、花的发育^[6]、生长发育过程中的时相转换^[7]、参与叶片的形成与发育^[8]、应对逆境胁迫^[9-10]等功能。随着研究的不断深入, 在众多 miRNA 家族中, miR172 在植物开花时间以及生长发育过程中起着极为关键的调控作用。

1 miR172 及其靶基因调控植物开花

迄今的研究已经对拟南芥光周期调控开花的机制有了较为深入的了解, 尤其 miR172 途径^[11]的发现更是光周期开花调控途径研究中的一个重大突破。miR172 通过调控其靶基因的表达, 控

制开花时间和花器官的形成, 其靶基因为 AP2(APETALA2)以及 AP2 家族类(AP2-like)的转录因子, 此家族基因包括一个或者一个以上 AP2 保守结构域, 由 60~70 个氨基酸组成, 并且在每个 AP2 保守结构域中还有两个保守元件, 分别为 YRG motif 和 RAYD motif^[12-13]。拟南芥中涉及开花时间的 AP2 类基因包括 AP2 基因本身、TARGET OF EAT (TOE1, TOE2, TOE3)、SCHLAFMÜTZE (SMZ) 和 SCHNARCHZAPFEN(SNZ)^[6, 11, 14-17]。

对于开花植物来说, 花器官的发育在植物发育过程中是一个极为重要的阶段。miR172 及其靶基因对植物开花时间和花器官的分化起关键的调控作用。在拟南芥中, 除了 TOE3 基因外, 过表达其中任何一个 miR172 的靶基因都会表现出延迟开花^[11, 18-19], 而 TOE3 基因在拟南芥的开花转型和花的形态方面发挥重要作用^[20]。与之相反, 缺失功能的 toe1 突变体、toe1/toe2 双突变体 toe1/toe2/snz 三突变体、toe1/toe2/snz/ap2 六突变体均表现出了早花, 而且早花的程度随着突变基因的增多而提前^[11, 21-22], 一方面说明 AP2 家族基因间存在着功能上的冗余, 另一方面表明 AP2 类基因对拟南芥的开花时间调控具有抑制作用。

然而, 过量表达 miR172 的植株不仅能够提前开花, 而且还导致拟南芥非正常的花发育, 包括花瓣缺失以及萼片向心皮的同源转化^[6, 11, 18, 21], 表现出与 ap2 突变体一致的性状, 却与其靶基因过表达的表型相反。AP2 家族在花器官 ABC Model 中属于 A 类基因, 若该类基因缺失, 花

收稿日期: 2017-01-10

第一作者简介: 赵晓晖(1985-), 女, 内蒙古赤峰市人, 博士, 助理研究员, 从事大豆光周期对开花与产量性状的调控研究。E-mail: zhaoxiaohui@iga.ac.cn。

通讯作者: 刘宝辉(1964-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 研究员, 从事作物分子遗传育种研究。E-mail: liubh@neigaeherb.ac.cn。

被(Perianth organs)会取代花结构中的生殖器官(*Reproductive organs*)^[23]。当在 AP2 与 miR172 结合的位置引入 6 个碱基突变,成为 miR172 的抗性基因,结果产生了大量的花瓣并且雄蕊退化^[18],与上述 A 类基因缺失的表型类似。

短日照植物大花牵牛(*Ipomoea nil*),miR172 的靶基因 InAP2-like 在幼苗期的子叶中表达量较高;在非诱导光长日照处理(16 h 光照/8 h 黑暗)条件下,InAP2-like 的表达量增加而 miR172 的积累量却降低;与此相反,生长素、乙烯处理以及消除大花牵牛开花诱导的暗中断(Night-break)处理,InAP2-like 的转录水平却明显降低^[24]。这些结果表明 miR172 及其靶基因调控大花牵牛的开花诱导。另外,miR172 在大豆(*Glycine max*)^[25]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[13]等植物的开花调控中也有报道。

随着研究的不断深入,对 miR172 及其靶基因调控开花分子机制的研究也有报道。植物 miR172 的表达会随着生长发育而增加,与之相对应的靶基因会逐渐降低,但是与 miRNA 代谢相关的基因 *Dicer-like1*(DCL1)和 *SERRATE*(SE)的表达水平并没有改变^[11,26-27],表明 miR172 对其靶基因的调控主要是通过转录抑制来发挥作用^[6,28]。Jung 等^[11]研究发现在拟南芥的光周期开花途径中 GI 除了调控 CO 的表达以外,还调控 miR172 及其靶基因 TOE1,即便是在缺失功能的 co 突变体中过表达 miR172,植株都会提前开花,无论在长日照还是短日照条件下。因此,表明 miR172 促进光周期开花是不依赖于 CO 基因的一条独特途径,miR172 途径的发现是对光周期开花调控途径的一个完善,具有重要的意义。

大豆 miR172 的靶基因 GmTOE4a 过表达后,转基因植株在长、短日照条件下均晚花,并且研究发现 GmTOE4a 延迟从营养生长到生殖生长期的转换是通过抑制开花相关基因 GmFT2a、GmFT5a、GmAP1、GmLFY 的表达、而促进 GmFT4 和 miR156 的表达实现的。进一步研究发现 GmTOE4a 参与的光周期调控大豆开花途径是在编码光敏色素 A 的 E3 和 E4 作用下,依赖于 GmCOL1a 途径实现的,并且在转录水平不受 GI 同源基因 E2 的调控,呈现出与模式植物拟南芥保守而又不同的调控机制^[25]。后续 Zhai 等的研究发现,拟南芥 AP2 家族转录因子 TOE1、TOE2

能够与 Jasmonate-ZIM domain 蛋白互作,当植物遇到胁迫的环境时,JAZ 蛋白会降解进而释放出 TOEs,TOE1 结合在开花基因 FT 的启动子上,下调 FT 的表达,最终表现出延迟开花^[29]。

综合前人的研究可知,植物 miR172 及其靶基因在开花网络调控中处于关键的节点,对开花时间、花分生组织的形成以及花器官的发育等起着举足轻重的调节作用。

2 miR172 及其靶基因调控植物的生长发育

2.1 miR172 及其靶基因对植物生长发育的调控

在拟南芥的生长发育过程中,miR172 的表达呈现出逐渐增加的趋势,并且在花芽中的表达量最高,主要在生殖生长阶段起作用;而其靶基因 TOE1、TOE2、SMZ 和 SNZ 的表达量却随着生长发育进程的持续而逐渐降低,在生殖器官花芽中并不表达^[6,11,21],主要维持营养生长。靶基因的表达模式刚好与 miR172 互补,且它们的表达均随着生长发育时期而发生变化。

单子叶植物玉米(*Zea mays*),通过转基因的方式过量表达 miR172 的靶基因 *glossy15*(*gl15*),转基因植株不仅增加幼叶数量而且延迟进入生殖生长阶段,表明 *gl15* 基因能够维持幼年期的特征,抑制玉米从幼年期向成年期的转变。此外,在玉米幼苗中,miR172 的积累量较高,而 *gl15* 的转录水平却很低,情况与拟南芥中的表达一致,表明 miR172 通过调控其靶基因 *gl15* 调节幼叶向成熟叶的转变^[28]。

模式植物水稻(*Oryza sativa*),miR172 在营养生长后期和花序发育时高表达,尽管在花序发育时期穗中的表达有所减弱,当受精 10 d 后已经检测不到 miR172 的表达。在水稻的整个生长发育过程中,miR172 在茎叶中呈现逐渐增加的趋势,并在剑叶中表达最高。在营养生长末期和生殖生长初期的积累量最高,研究结果表明 miR172 与花序发育以及花序起始发育的时相转换有关^[30]。

马铃薯(*Solanum tuberosum*)为短日照植物,在诱导光照短日照条件下,miR172 的表达水平比长日照处理高,并且块茎形成时在匍匐枝中上调表达。miR172 的靶基因为 *RELATED TO APETALA2 1*(RAP1)为包含有两个 AP2 保守结构的 AP2-like 基因。当 miR172 过表达时,其靶基因被下调表达,转基因马铃薯植株不仅能够

提前开花,而且还能加速块茎的形成,即便是在非诱导光照条件下^[13]。块茎的形成也是一个和生殖相关的发育过程,miR172 及其靶基因在马铃薯的生长发育过程中也具有重要的调控作用。

大豆 miR172 的靶基因 *GmTOE4a* 基因不仅对大豆开花起调控作用,而且调控大豆的发育。*GmTOE4a* 转基因植株与野生型相比,植株形态发生了变化,包括植株矮化、叶片变小、节间缩短和主茎增粗,增加抗倒伏能力,呈现出了理想的大豆株形^[25]。综合分析不同物种的 miR172 及其靶基因,在单双子叶植物中对生长发育方面的调控作用是保守的。

此外,有报道 miR172 具有可传递性。马铃薯 miR172 主要分布在维管束组织中,并且通过嫁接实验证明了 miR172 有可能可以在维管束中移动,或者它可以调控长距离信号移动以此调节块茎的形成^[13]。另外,关于 miR172 可以长距离移动在烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 中也有发现^[31]。如果植物 miR172 可以长距离移动的特性在不同物种中是保守的,那么对于 miR172 功能的研究提供了一个快速而简捷的方法,并且可以保持其它原有的性状不发生任何改变,提供较为一致的遗传背景。关于 miR172 长距离移动的问题有待于在不同物种中做深入的研究。

2.2 miR172 与 miR156 共同调控植物的生长发育

植物生命周期所经历的发育转型和发育时间是集外在和内在复杂的信号网络综合作用的结果,从上述各物种 miR172 及其靶基因的表达与功能可以看出,它们在植物生长发育过程中发挥调控作用,并且这种功能是相对保守的。此外,有报道 miR172 作用于 miR156 的下游促进植物成年特征 (Adult epidermal identity) 的出现^[16,21,32]。miR156 也是很保守的 miRNA 家族,在拟南芥、玉米和水稻等植物中都存在,其靶基因是 SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL) 转录因子,在发育转型时起作用,miR156 是幼年期的主要调控因素^[7,33-34]。拟南芥中 *SPL* 基因被划分两大类:*SPL3/4/5* 参与开花时间和发育过程中的时相转换;*SPL9* 和 *SPL15* 调控叶的起始以及时相转换^[33,35-37]。*SPL3* 分布于茎尖组织,在播种 15~22 d 后的幼苗中含量急剧上升,拟南芥中过量表达 *SPL3* 和 *SPL9* 刺激开花,而 miR156 过表达则通过下调 *SPL* 基因的活性使叶片数目

增加,延迟开花^[7]。

miR156 在整个幼年营养生长阶段都有表达,在营养生长阶段的成年期转变过程中表达量减少。miR156 的靶基因 *SPL* 通过对一类 *MADS box* 基因的调控,控制了成年期到生殖生长期的转变^[38-39]。miR156 是植物生命周期转型的主要调控因子,不仅控制从营养生长阶段到生殖生长阶段的转变,还控制幼年期到成年期的转变。在玉米中,miR156 由异时基因编码,伴随着 miR156 表达量的增加,植株分蘖数量增加,并且矮化^[40]。拟南芥的 miR156 转基因植株,叶柄会变长,叶片变小,与幼叶形态相似^[33]。水稻中 miR156 过表达,表现出植株矮小,节数增加,分蘖数也大大增加,穗的枝梗数减少甚至无枝梗,并且延迟开花^[41]。

miR156 和 miR172 的表达模式截然相反,并且分别维持营养生长和生殖生长阶段。后续的研究发现,二者并不是完全独立的两条途径,而是 miR156 通过其靶基因 *SPL9* 调控 miR172 的表达,*SPL9* 和 *SPL10* 功能冗余的直接促进 miR172b 的转录^[16-17,32]。随后又有研究发现,在拟南芥的幼年向成年转型过程中,当 miR172 过表达时 *SPL3/4/5* 会上调表达,并且不依赖于 miR156。

在大豆中也发现 miR172 途径与 miR156 及其靶基因 *GmSPL3/9* 有调控关系。在 miR172 靶基因 *GmTOE4a* 的过表达转基因大豆植株中,miR156 的积累量在叶片和顶端分生组织中均显著增加,而 *GmSPL3/9* 基因与野生型相比显著降低^[25];当 miR156 过表达时,miR172 下调表达,其靶基因 *GmTOE* 上调表达^[42]。因此,以基因 *SPL3/4/5* 为交叉点,miR172 途径被归为 miR156 信号途径^[21],miR156 和 miR172 之间可能存在着一定的平衡关系,从而调控植物在适当的时间发育并完成发育阶段的时相转换,进而繁殖产生后代,以保证物种的延续。

3 展望

目前,对植物 miR172 及其靶基因的研究还停留在反向遗传学水平,依据模式植物拟南芥的进展在其它物种中展开,只针对 miR172 及其靶基因家族中的某个成员,并且主要在转录水平进行研究。因此,在未来很长一段时间内 miR172 及其靶基因在调控植物开花和生长发育方面的研究还将继续和深入。当下,随着测序技术的不断

更新和生物信息学的迅猛发展,尤其 CRISPER/CAS9 基因编辑技术的诞生及应用,miR172 及其靶基因的研究将会有突破性的进展,为农作物及经济作物中重要农艺性状的改良及分子设计育种奠定基础。

参考文献:

- [1] Ambros V. MicroRNAs: tiny regulators with great potential[J]. Cell,2001,107:823-826.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. Cell,2004,116:281-297.
- [3] Liave C,Xie Z,Kasschau K D,et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science,2002,297:2053-2056.
- [4] Elbashir S,Martinez J,Patkaniowska A,et al. Functional anatomy of siRNAs form ediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. EMBO J, 2001, 20, 6877-6888.
- [5] Enright A J,John B,Gaul U,et al. MicroRNA targets in *Drosophila*[J]. Genome Biol,2003,5(1):R1.
- [6] Aukerman M J,Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes[J]. Plant Cell,2003,15:2730-2741.
- [7] Schwab R,Palatnik J F,Riester M,et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. Dev Cell,2005, 8:517-527.
- [8] Palatnik J F,Allen E,Wu X,et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J]. Nature,2003,425:257-263.
- [9] Fujii H,Chiou T J,Lin S I,et al. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*[J]. Current Biology,2005,15(22):2038-2043.
- [10] Zhao B T,Ge L F,Liang R Q,et al. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor[J]. BMC Molecular Biology,2009,10(1):29.
- [11] Jung J H,Seo Y H,Seo P J,et al. The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2007,19:2736-2748.
- [12] Okamuro J K,Caster B,Villarroel R,et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997,94(13):7076-81.
- [13] Martin A,Adam H,Diaz-Mendoza M,et al. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172[J]. Development,2009,136:2873-2881.
- [14] Bowman J L,Smyth D R,Meyerowitz E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*[J]. Development,1991,112:1-20.
- [15] Jofuku K D,Boer B G,Montagu M V,et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2[J]. Plant Cell,1994,6:1211-1225.
- [16] Huijser P,Schmid M. The control of developmental phase transitions in plants [J]. Development, 2011, 138: 4117-4129.
- [17] Zhu Q H,Helliwell C A. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172[J]. Journal of Experimental Botany,2011,62 (2):487-495.
- [18] Chen X. A microRNA as a translational repressor of AP-ETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. Science, 2004,303:2022-2025.
- [19] Mathieu J,Yant L J,Mürdter F,et al. Repression of flowering by the miR172 target SMZ[J]. PLoS Biol, 2009, 7(7):e1000148. doi:10.1371/journal.pbio.1000148.
- [20] Jung J H,Lee S,Yun J,et al. The miR172 target TOE3 represses AGAMOUS expression during *Arabidopsis* floral patterning[J]. Plant Science,2014,215-216:29-38.
- [21] Jung J H,Seo P J,Kang S K,et al. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions[J]. Plant Mol Biol,2011,76:35-45.
- [22] Yant L,Mathieu Johannes,Dinh T T,et al. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2[J]. The Plant Cell,2010,22:2156-2170.
- [23] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control[J]. Plant Cell,2004,16(Suppl):51-17.
- [24] Glazińska P,Zienkiewicz A,Wojciechowski W,et al. The putative miR172 target gene InAPETALA2-like is involved in the photoperiodic flower induction of *Ipomoea nil*[J]. Journal of Plant Physiology,2009,166:1801-1813.
- [25] Zhao X H,Cao D,Huang Z J,et al. Dual functions of Gm-TOE4a on the regulation of photoperiod-mediated flowering and plant morphology in soybean[J]. Plant Molecular Biology,2015,88(4):343-355.
- [26] Schauer S E,Jacobsen S E,Meinke D W,et al. DICER-LIKE1: Blind men and elephants in *Arabidopsis* development[J]. Trends in Plant Sci,2002,7:487-491.
- [27] Yang L,Liu Z,Lu F,et al. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*[J]. Plant J,2006,47:841-850.
- [28] Lauter N,Kampani A,Carlson S,et al. microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102:9412-9417.
- [29] Zhai Q Z,Zhang X,Wu F M. Transcriptional Mechanism of Jasmonate Receptor COI1-Mediated Delay of Flowering Time in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2015, 27 (10) 2814-2828.
- [30] Zhu Q H,Upadhyaya N M,Gubler F,et al. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*) [J]. BMC Plant Biology,2009,9:149.
- [31] Kasai A,Kanehira A,Harada T. miR172 can move long

- distances in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Open Plant Sci.*, 2010, 4: 1-6.
- [32] Wu G, Park M Y, Conway S R, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, 138: 750-759.
- [33] Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3 [J]. *Development*, 2006, 133: 3539-3547.
- [34] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39: 1033-1037.
- [35] Cardon G, Höhmann S, Nettesheim K, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition [J]. *Plant*, 1997, 12: 367-377.
- [36] Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, et al. The miR-NA156/157 recognition element in the 3'UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings [J]. *Plant*, 2007, 49: 683-693.
- [37] Schwarz S, Grande A V, Bujdosó N, et al. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 183-195.
- [38] Wang J, Schwab R, Czech B, et al. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1231-1243.
- [39] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 2009, 138 (4): 738-749.
- [40] Chuck G, Meeley R, Irish E, et al. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1 [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(12): 1517-1521.
- [41] Xie K B, Wu C Q, Xiong L Z. Genomic organization, differential expression, and interaction of Squamosa Promoter-Binding-Like transcription factors and microRNA156 in rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142: 280-293.
- [42] Cao D, Li Y, Wang J L, et al. GmmiR156b overexpression delays flowering time in soybean [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(4): 353-363.

Research Progress of miR172 and Its Targets in the Regulation of Flowering and Development

ZHAO Xiao-hui¹, KONG Fan-jiang¹, LIU Bao-hui^{1,2}

(1. Key Laboratory of Soybean Molecular Design Breeding, Northeast Institute of Geography and Agroecology, CAS, Harbin, Heilongjiang 150081; 2. College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: For flowering plants, the growth and development process, the formation of flower organ and flowering in the right time, which are the basis of plant survival and race continues. The progress of miR172 and its targets in the regulation of flowering and development were summarized, aim to better understanding the mechanism of miR172 and its targets, the foundation was laid for the improvement of important agronomic characters and molecular design breeding.

Keywords: miR172; flowering period; growth and development

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网
络出版总库》及CNKI等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。
如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部