

· 综 述 ·

兰科植物 microRNA 的研究进展

徐子涵¹, 陈跃², 胡凤荣¹

1 南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037

2 浙江省农业科学院 园艺研究所, 浙江 杭州 310021

徐子涵, 陈跃, 胡凤荣. 兰科植物 microRNA 的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(1): 66-76.

XU ZH, CHEN Y, HU FR. Advances in the research of microRNA in Orchidaceae. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 66-76.

摘 要: microRNA (miRNA) 是一类广泛存在的非编码小分子 RNA, 在植物的生长发育和应激反应等过程中起到重要的调控作用。本文从 miRNA 在植物中的作用机制出发, 对近 10 年来兰科植物各属 miRNA 的鉴定、几类 miRNA 的具体功能及 miRNA 的其他相关技术研究进行综述, 以期 为兰科植物小分子 RNA 的功能作用及调控网络解析提供参考。

关键词: 兰科; miRNA; 靶基因; 调控功能

Advances in the research of microRNA in Orchidaceae

XU Zihan¹, CHEN Yue², HU Fengrong¹

1 College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

2 Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

Abstract: As a class of small non-coding RNAs, microRNA (miRNA) is widely present and plays important regulatory roles in plant growth, development and stress response. Based on the mechanism of miRNAs in plants, we review the identification of miRNAs in some genera of Orchidaceae, the specific functions of several miRNAs and other relevant studies on miRNAs in the last decade, in order to provide a reference for better understanding function and regulatory network of small RNAs in orchids.

Keywords: Orchidaceae; microRNA; target genes; regulatory functions

Received: February 3, 2021; **Accepted:** March 27, 2021; **Published online:** April 29, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31801891); Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions, China (PPZY2015A063)

Corresponding author: HU Fengrong. Tel: +86-25-85427090; E-mail: hufengrong2003@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31801891); 江苏高校品牌专业建设工程 (PPZY2015A063)

兰科 (Orchidaceae) 是最大的观赏花卉家族之一, 全球约有 800 属、25 000 种, 主要分布于热带和亚热带地区, 少数也见于温带, 具有高度专业化的繁殖策略和极为多样化的花朵^[1-2], 是研究被子植物发育和进化的良好模式类群, 并且在世界花卉市场上扮演着至关重要的角色。但兰科植物的基因组很大, 其发育的分子机理与同为单子叶植物的水稻 *Oryza sativa*、玉米 *Zea mays* 等相比更加复杂^[3], 且尚未建立稳定、高效、快速的遗传转化体系, 使得其功能基因组研究与相关基因的挖掘受到极大的限制。

近 10 年逐渐兴起的兰科植物分子生物学研究, 是揭示其发育和代谢机理的重要途径, 能够准确、有效地调控各类发育的方向和进程, 新近成为研究热点的 microRNA (miRNA) 也在兰科植物中逐渐得到关注。基于多组学数据的分析, 无论是保守 miRNA 还是新型 miRNA 均逐渐被分离和鉴定, 不同组织器官、发育时期和逆境响应的转录组测序和表达谱分析正在逐步阐明兰花内部的分子调控网络, 特有的 miRNA 数据库分析技术也得到挖掘。本文主要对 miRNA 的作用机制及其在兰科植物中的鉴定和功能研究进行综述, 为今后兰花的定向培育及种质创新工作提供一定的理论参考。

1 miRNA 在植物中的作用机制及功能

miRNA 是一类 18–25 nt 的非编码小分子 RNA, 它起源于初级转录物 pri-miRNA 加工剪切形成的前体 pre-miRNA, 能够自我配对并形成发夹结构。在植物中, 核酸内切酶 DCL1 从 pre-miRNA 中切除 miRNA:miRNA* 双链, 其中成熟的 miRNA 被称为引导链 (guide strand), 而对应的另一条链 miRNA* 为过客链 (passenger strand); 随后, 大多数过客链序列被迅速降解, 引导链则被 RNA 诱导沉默的 RISC 复合物吸

收, 其核心成分是蛋白质 AGO (Argonaute) 1, 这种复合物指导 miRNA 与其靶 mRNA 之间相互作用, 从而通过剪切或翻译抑制其表达^[4-5]。

2002 年, Park 等首次在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中解析了 miRNA 与其靶基因的作用机制, 其中 *MIR172* 与其靶基因 *AP2* 的 mRNA 呈现完全互补配对的状态^[6], 后期的研究者也逐渐发现, 相较于动物中依赖种子序列的配对, 植物 miRNA 与靶基因的互补程度更高, 多数情况下只存在 4 个碱基以内的错配, 且其主要结合于靶基因的编码区, 少数结合在靶基因 mRNA 的 3' 端^[7]。被剪切的 mRNA 大部分进入核酸外切酶降解途径, 少数可产生 phasiRNA, 对产生 phasiRNA 的转录本发挥负调控作用^[8]。此外, 早期研究者普遍认为, miRNA 的作用方式与其序列互补的程度有关, 匹配度高则进行靶标 mRNA 的剪切, 反之则抑制其翻译^[9-10], Brodersen 等^[11]的研究打破了这一结论, 指出翻译抑制是植物 miRNA 作用的一种普遍模式, 这和其与 mRNA 的互补程度及靶位点的位置无关, 某些植物的 miRNA 与靶基因即使呈现出完美的互补性, 也可在翻译水平上进行显著抑制。

现如今, miRNA 被应用于植物研究的多个实践领域, 其所作用的生物学功能范围十分广泛, 从根、茎、叶的发生到成花诱导、器官形成、繁殖和胁迫响应, miRNA 在不同生物学过程中都发挥着至关重要的作用^[12-13]。诸如 miR156、miR172、miR165/166 和 miR319 等主要在器官发育中起调控作用, miR169、miR393、miR398 等则常见对各类逆境胁迫做出响应^[14], miR167、miR160 和 miR159 等被发现与激素分泌调节有关^[15]。从模式植物到经济作物、药用植物、观赏花卉, 各 miRNA 家族的功能及作用机制正在解析, 它们在生物体内所构成的分子调控网络也逐步建立起来。

2 组学背景下兰科植物 miRNA 的鉴定

2.1 蝴蝶兰属 miRNA 的鉴定

蝴蝶兰属 *Phalaenopsis* 植物是兰科植物中观赏价值最高、销售最广的类群之一,在分子生物学方面的研究十分丰富。为挖掘响应低温的小分子 RNA, An 等^[16]首次对蝴蝶兰一亚种 *P. aphrodite* subsp. *formosana* 的转录组、sRNAs 和降解组进行分析,鉴定出 15 个丰富的保守 miRNA 家族及 29 个靶基因,并为一些 miRNA 预测了兰科植物所特有的非保守靶基因,如 miR172/半胱氨酸蛋白酶 RD19a、miR159/激酶相互作用蛋白 (kinase-interacting protein) 和脉络膜突变酶 (chorismate mutase), GO 分析发现它们主要参与植物的发育过程和应激反应;深度测序鉴定出 471 个新型 miRNA 序列,但仅其中 14 个具有靶标转录本,其同源物在转录调控、RNA 加工、光合作用、ATP 代谢和细胞通讯中具有调控作用。

Wang 等^[17]又从蝴蝶兰已知序列^[18]中发现了 30 个潜在的 miRNA,它们属于 26 个 miRNA 家族,并显示出明显的大小差异;研究者还预测了 193 个蝴蝶兰基因作为其中 20 个 miRNA 的潜在靶基因,利用 qRT-PCR 技术验证了这些预测靶标对在各组织中的表达水平,推测这些 miRNA 和靶基因可能参与调控开花植物的花器官形态 (miR5021)、花朵颜色 (miR854) 和开花时间等,为蝴蝶兰 miRNA 的研究提供了新的见解。

进而,Chao 等^[19]用中国台湾特有蝴蝶兰的各组织集中构建了小 RNA 转录组文库,共鉴定出 181 个已知的植物 miRNA (隶属 88 个 miRNA 家族)、23 个新型 miRNA 及 91 个前体,并筛选出 240 个潜在的 miRNA 靶基因,使用 RLM-5' RACE 技术验证了几个剪切位点,如 miR166/*HOX32*、

miR162/*DCL1* 等;功能注释结果表明,在预测的靶基因中,27.5%是转录因子家族成员,9.5%编码功能未知或生物过程未知的蛋白质,6.7%编码参与信号转导的蛋白质,5.4%是发育相关基因,其他基因则参与蛋白质降解、次生代谢、氧化还原等生物体各方面的多种过程,这些均暗示了 miRNA 在植物体内功能作用的普遍性。

Zhao 等^[20]则单独针对其萼片斑点的形成机制进行探究,通过对蝴蝶兰‘大熊猫’ (*P. ‘Panda’*) 和无斑点萼片组织的转录组和小 RNA 文库对比分析,共检测出 1 662 个差异表达的 miRNA,其中 676 个下调、876 个上调,并从中筛选出 2 个主要的 miRNA——miR156g 和 miR585,结合它们调控的靶基因 *R2R3-MYB* 在花青素积累过程中的关键作用,建立了花被片斑点形成的分子调控网络,为其他物质的类似研究提供参考。

关于蝴蝶兰基因组的测序工作也在进行中,继 Cai 等^[21]对小兰屿蝴蝶兰 *P. equestris* 基因组测序的报道之后, Huang 等^[22]对一种冬季开花蝴蝶兰品种‘KHM190’的基因组进行了初步组装,从中产生了 1.13 亿个 sRNA 序列,以此为基础鉴定了 650 个 miRNA,分属 188 个 miRNA 家族,并预测了 1 644 个靶基因,经注释发现它们大多与花器官发育、开花时间及原球茎 (胚) 发育相关,该研究为蝴蝶兰的栽培效率和遗传改良提供了建设性的参考资源。

2.2 石斛属 miRNA 的鉴定

石斛属 *Dendrobium* 植物是重要的药用和观赏植物,其研究多集中于器官发育、繁殖及次生代谢方面。在进行 miRNA 器官特异性的表达分析时, Meng 等^[23]结合 RNA、sRNA 和降解组测序对铁皮石斛 *D. officinale* 进行了常规研究,从根、茎、叶、花 4 个器官中共检测到 1 047 个候选的成熟 miRNA,基于二级结构预

测鉴定出数十种潜在的 miRNA 前体,并在其中两个前体的茎环结构上发现了具有降解产物的相分布 sRNAs;对 1 047 个候选 miRNA 进行靶向鉴定,发现了 1 257 个 miRNA 靶标对,最终建立了包括激素信号转导、发育和次生代谢相关的亚调控网络。Yu 等^[24]则以上述研究者的测序数据为基础继续进行分析,从花、叶、根、茎中分别鉴定出了 122 个、108 个、4 个和 4 个成熟的 miRNA,并预测了 miRNAs 的器官特异性表达模式。

此外,Yang 等^[25]曾比较铁皮石斛的 miRNA 在常规繁殖和微体繁殖中的表达区别,鉴定了来自 37 个家族共 120 个 miRNA,发现有来自 6 个家族的 45 个 miRNA 差异表达,其中微体繁殖组包括 5 个上调家族 (miR156 等) 和 1 个下调家族 (miR167),功能预测得出这些 miRNA 主要与激素信号响应、生物和代谢过程的调节、细胞器形成以及核酸结合有关。最近,Krishnatreya 等^[26]报道了 14 个来自石斛 *D. nobile* 3 个 EST (expressed sequence tag) 的 miRNA,它们属于 miR390、miR528 和 miR414 这 3 个 miRNA 家族,与转录因子调控、信号转导、DNA 和蛋白质的结合等过程相关。这些研究均有助于石斛 miRNA-mRNA 功能网络的解析。

2.3 兰属 miRNA 的鉴定

兰属 *Cymbidium* 植物的相关研究集中于国内学者对几类传统国兰花发育方面的探索。Li 等^[27]利用 Solexa 技术对建兰 *C. ensifolium* ‘铁骨素’两个开花期的 4 个小 RNA 文库进行测序,确定了 48 个保守的成熟 miRNA 和 71 个前体,以及 45 个新型 miRNA;研究者利用 GO、KEGG 等生物信息技术对这些 miRNA 及其靶基因进行注释,发现这些已注释的小 RNA 大多集中在非特征组中,表明可能还存在许多新颖的非编码小 RNA。这一研究为 miRNA 介导的国兰的

花发育调控机制奠定了基础。近几年,Yang 等^[28-29]又对春兰 *C. goeringii* 野生型和多花被片突变体的 miRNA 表达谱进行了分析,结果显示有 132 个保守的 miRNA 家族在花中表达,对应 6 459 个可能的靶标;基于深度测序数据发现,其中有 11 个 miRNA 与 455 个可能的靶基因相对应,在两个转录组之间差异表达,这说明它们与花被的发育有着密切的关系。

2.4 文心兰属 miRNA 的鉴定

文心兰 *Oncidium* 是常见的切花植物,具有极高的经济价值,但其切花高峰期恰在高温高湿季节,易受各类病原菌的侵袭^[30]。因此,探究文心兰的抗病机理对其产业发展尤为重要。现有报道多针对欧文氏菌 *Erwinia* spp.引起的文心兰软腐病进行研究,该菌株是一种重要的破坏性病原体,能够在包括兰花在内的多种植物中引起病害^[31-32]。王培育等^[33-34]基于对文心兰 *O. hybridum* ‘南茜’转录组及 miRNA 数据库的分析,发现 miRNAs 及其靶基因在文心兰正常植株和假鳞茎不同感病时段表达均存在差异,从中筛选出 25 条前体序列和 15 条成熟体序列,并预测出 828 个候选靶标,其中 67 个可能与抗病相关,如 F-box 蛋白、RGA 抗病蛋白等。Ye 等^[35]鉴定了文心兰另一品种 (*O.* ‘Gower Ramsey’) 的 miRNA 预测靶标 *NBS-LRR* (nucleotide binding site-leucine rich repeat) 抗性基因,分析发现欧文氏菌抑制了该基因在叶片中的表达,促进了几种调节性 miRNA 的积累,如 miR2118、miR5246、miR1510a*等,它们与感染后病害的发展、茉莉酸和水杨酸的积累、乙烯和过氧化氢的合成有关;另外,印度梨形孢 (*Piriformospora indica*) 对文心兰根的定殖限制了欧文氏菌诱导的叶片病害的发生,这一过程伴随着一些防御相关抗性基因高表达及调控它们的 miRNA 低表达。

2.5 其他兰科植物 miRNA 的鉴定

除上述研究较多的属外,另有几种特色兰科植物的 miRNA 得到鉴定。如隶属扇叶兰属 (*Erycina*) 的小扇叶兰 *E. pusilla*, 它生命周期短,染色体数目相对较少,是兰花功能基因组学研究的潜在模式植物。Lin 等^[36]对其中来自不同器官、不同发育阶段的小 RNA 进行了测序,在 miRNA 混合物中已鉴定出了 33 个带注释的 miRNA 家族和 110 个 miRNA 靶基因。红门兰属 (*Orchis*) 意大利红门兰 *O. italica* 的花序组织小 RNA 库也已得到分析,共鉴定出 23 个保守的 miRNA 和 161 个新型 miRNA 家族^[37]。此外,Esfeld 等^[38]对 5 个矿坑和 11 个自然栖息地的新疆火烧兰 (*Epipactis palustris*) 的 16 个种群的遗传结构和多样性进行了研究,该研究运用了 miRNA 的基因组指纹图谱 (miRNA-primed genomic fingerprinting) 标记方法,产生了 89 条信息带,最终结果显示,采矿区和自然栖息地的种群多样性之间并无差异。

3 兰科植物 miRNA 的功能研究

3.1 参与调控器官发育及阶段转换

3.1.1 miR156

miR156 是植物体内一类非常保守的 miRNA,分布范围较为广泛,能够调控多个器官的生长发育^[39]。在兰科植物中,多类组织器官中均能检测到 miR156 的存在:Chao 等^[19]在蝴蝶兰中观察到,miR156 家族在叶、根、花及种子中均有表达,且其在种子中的表达量远高于在花中的表达量;该家族的成员 miR156g 还特定参与了蝴蝶兰品种‘大熊猫’ (*Phalaenopsis* ‘Panda’) 萼片紫色斑点的形成^[20]。在春兰中,miR156 与其靶基因 *SPL* 相互作用,通过调控生殖器官的发育,共同参与了多花被片性状的发生^[28]。黄石斛 *Dendrobium catenatum* 的 miR156

则在原球茎 (胚) 中大量积累,在幼苗生长过程中下降,且其靶基因 *SPL* 家族成员 *DcSPL14*、*DcSPL7* 和 *DcSPL18* 的表达模式与其相反,呈现上升趋势^[40]。

此外,miR156 还是连接“年龄”与植物生长发育的重要中介分子,主要在幼年到成年期的转变及成花诱导方面发挥作用^[41]。An 等^[42]研究了几类 miRNA 在蝴蝶兰中的组织特异性表达,发现 miR156 可能介导了蝴蝶兰营养生长期向生殖生长期的过渡,且其靶基因 *PaSPL* 与其表达模式互补。Lin 等^[36]在小扇叶兰中也发现,epu-miR156 在植物各器官和发育阶段中丰度最高,它能够通过抑制靶基因 *EpSPL1/2/3/4/7/9/10/14* 的转录和表达来维持植物的营养生长期。黄石斛 miR156 的一个靶基因 *DcSPL3* 仅在成年植株中显著表达,并且与植株的成熟有关^[40],这些研究均暗示了 miR156 在兰科植物各阶段转换中发挥着不可替代的作用。

3.1.2 miR172

作为另一大类保守的 miRNA 家族,miR172 的分布也十分广泛,如文心兰 miR172a 在假鳞茎与叶中大量表达^[34],蝴蝶兰的 miR172-1、miR172-2 则在根、茎、花梗和幼芽中均有表达,且以花梗中的表达水平为最高^[43-44]。值得注意的是,这两类保守的 miRNA——miR156 和 miR172,在植物体内存在一定的相互作用^[45-46],兰科植物的相关研究者也对此进行了密切关注:Chao 等^[19]发现蝴蝶兰 miR172 在花中的表达水平远高于叶,并且在根和种子中的表达水平非常低,这与 miR156 的表达模式恰好相反,证明这一作用关系在兰科植物中仍然存在;An 等^[42]的定量分析结果与其类似,认为 miR172 与 miR156 一同介导了蝴蝶兰生长阶段的转换。

miR172 的主要作用集中在开花调控方面,Han 等^[43]曾在拟南芥中过表达蝴蝶兰的

PhmiR172-2 基因,发现转基因株系的开花期比对照组提前约 3 d 左右。Salemme 等^[47]针对意大利红门兰的 miR172 及其靶基因 *OitaAP2-like* 的两种亚型在花器官发育中的作用进行了详细研究,发现 *AP2* 在开花前和开花后的花被片、唇瓣以及授粉前的子房、根、茎中均有表达,miR172 在开花前花序组织中的表达谱与其互补,而在开花后和授粉前后的子房组织中该种关系消失,表明 miR172 与 *AP2* 在不同时期、不同组织中存在着不同的调控机制。

3.1.3 miR319

miR319 是植物叶片及花器官生长发育过程中有调控功能的一类 miRNA 家族,其靶基因是一类名为 TCP 的转录因子^[48]。在蝴蝶兰^[16]、建兰^[27]、春兰^[28]、意大利红门兰^[37]等兰科植物已鉴定出 miR319,部分研究者对其进行定量分析发现,miR319 在花中的表达量远高于其他组织^[19],且该 miRNA 在子房中的表达量明显高于其他花器官,这与其靶基因 *TCP* 的表达水平相反^[49]。在春兰中,miR319/*TCP4* 是参与多花被片性状形成的重要 miRNA/转录因子调控通路之一,它与 miR396/*GRF* (growth regulation factor) 通路一起主要通过调控细胞增殖来实现花器官数量的变异^[29]。

3.1.4 miR396

兰科 miR396 的研究现集中在细胞增殖导致的花、叶等器官的变化。徐子涵等^[50]对春兰 miR396 在不同时期叶片中的表达量进行测定,发现其在生殖生长期叶片中的表达量远高于营养生长期;将该 miRNA 前体过表达转入到拟南芥中发现,阳性株系的叶片大小及株高显著增大,这与前人在单子叶植物中的研究结果有一定出入^[51]。Yang 等^[28]发现 miR396 参与了花器官的形态建成,在春兰‘玉蝴蝶’中导致了多花被片

的出现。前人研究发现,miR396 在拟南芥等模式植物中能够通过调控 *GRF* 转录因子介导细胞的增殖过程、细胞形态变化及分生组织的生长^[52-53],因此,上述表型可能均由细胞分裂和分化过程的改变而形成。

3.2 参与调控各类应激响应

3.2.1 miR156

通过 GO 等各类生物信息分析技术,miR156/*SPL* 被预测出参与蝴蝶兰的各类应激反应^[16],An 等^[42]通过比较测序数据和 Northern 杂交实验证实,miR156 是低温诱导的 miRNA。另有 Petchthai 等^[54]发现在兰花花叶病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 侵染兰花的过程中,石斛 (*Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’) 的 miR156 在无病毒时呈现高水平表达,而当病毒侵染严重时仅低水平表达,表明 miR156 还参与病毒感染防御途径的调控。

3.2.2 miR159

王培育等^[33]发现,文心兰 miR159 的前体在叶中的表达远高于根和假鳞茎,且随软腐病菌侵染时间的延长呈下调趋势;而其成熟体 miR159a 在假鳞茎和叶中均呈现较高的表达水平,并在病菌侵染中后期大量表达^[34]。此外,在 miR159 结构的进化研究中,Tsai 等^[55]发现蝴蝶兰中的新型前体 pre-miR159 基因与其他植物存在差异,该前体基因的 5'和 3'折叠臂以及末端环经历了纯化选择和选择性约束,以稳定二级发夹结构。表明功能性选择压力可能来自对发夹结构形成的限制,并表现出新型 pre-miR159 基因 5'和 3'折叠区序列的协同进化。

3.2.3 miR528

miR528 在其他单子叶植物中的研究多见于对病毒防御、盐胁迫和氮饥饿等逆境胁迫的响应^[56-58]。在蝴蝶兰中,miR528 是一类低温诱

导的 miRNA^[42]; 千代兰 (*Ascocenda* ‘princess micasa’) 的 miR528 则能够响应 CymMV 病毒的侵染, 其表达谱的变化与症状的严重程度密切相关^[54]。

3.3 参与调控其他生物学过程

研究者对 miRNA 在兰科植物光合作用、信号转导及其他生物学过程中的作用也进行了初步探究。影响叶片发育的春兰 miR396 在转入拟南芥植株后, 引起了光合特性和叶绿素荧光参数的变化, 降低了其 PS II 受体侧的部分性能^[50]; miR159 主要靶向 *GAMYB* 基因家族^[59], Li 等^[27]在建兰中分离出 miR159, 发现其靶向的几个单基因参与花发育的各种激素信号通路, 推测它们与 MYB 转录因子存在一定关系; 此外, Krishnatreya 等^[26]近期还通过转录组数据预测出, 石斛 miR390、miR414、miR528 这 3 个 miRNA 家族共同参与了转录因子调控、信号转导、DNA 和蛋白质结合等过程。

4 兰科植物 miRNA 的新型技术研究

为进一步探究 miRNA 的功能, 一些新型的生物信息分析技术也被应用到兰科植物中: 2013 年, Su 等^[3]建立了一个专门的兰花数据库, 名为 Orchidstra (<http://orchidstra.abrc.sinica.edu.tw>), 以收集、注释和共享兰花功能基因组学研究的基因组信息。同时, 该研究小组对蝴蝶兰的小 RNA 进行了深度测序, 从而将该物种的信息扩展到 miRNA 的注释、前体和预测的靶基因, 进一步利用测序转录组信息设计寡核苷酸放射探针, 并进行表达谱分析。从不同组织的微阵列分析得到的杂交探针的强度作为功能证据的一部分被纳入数据库, 未来, 兰花数据库的内容将扩展到更多兰科植物的转录组数据和基因组信息。Tseng 等^[60]使用一种新的 miRNA

预测模型 (miRNA prediction model) 选择了 21 个蝴蝶兰的新型 miRNAs 进行预测并对其进行了实验验证, 其中已有 18 个 miRNA 在 qRT-PCR 实验中被证实, 如 Pm-1、Pm-2 和 Pm-20 在病毒感染时表现出积累量减少的趋势。Yu 等^[24]报道了一种用于植物 miRNA 鉴定和部分验证的途径 PmiRDiscVali, 该途径结合了 miRDeep-P^[61]工具用于植物 miRNA 的预测, 已在铁皮石斛中得到验证。

另外, 赵安瑾等^[62]以蝴蝶兰 miR858 在花萼色斑与非色斑的差异表达为实例, 摸索出在退火温度 65 °C、2 μg RNA 对应的模板 cDNA 稀释 10 倍后的扩增效果最佳, 为蝴蝶兰 miRNA 的实时荧光定量 PCR 体系的构建提供了实验基础。

5 总结与展望

miRNA 的作用范围十分广泛, 从根、茎、叶、花等基础器官的发育, 到各类逆境应答、激素响应, 对植物各类生物学过程都有较大作用。虽然 miRNA 具有高度保守性, 但在不同植物中仍存在很多特殊功能有待挖掘。兰科植物是一个特殊的群体, 有着与其他单子叶植物不同的生活方式和特化结构, 这在一方面也决定了其小 RNA 功能的特殊性。图 1 列举了一些与兰科植物器官发育及应激反应相关的主要 miRNA, 但目前来看, 关于兰科 miRNA 的研究主要集中在鉴定及表达模式分析方面, 绝大多数 miRNA 的功能仅仅停留在预测阶段, 未得到充分的实验验证, 各类 miRNA 与 mRNA 之前的调控关系也尚未明晰。因此, 透彻解析兰科植物 miRNA 在各生物学途径中的作用机制和调控网络是目前研究的重点和难点, 该问题的解决将对兰科植物种质资源的丰富、观赏价值和经济效益的提升产生极大的影响。

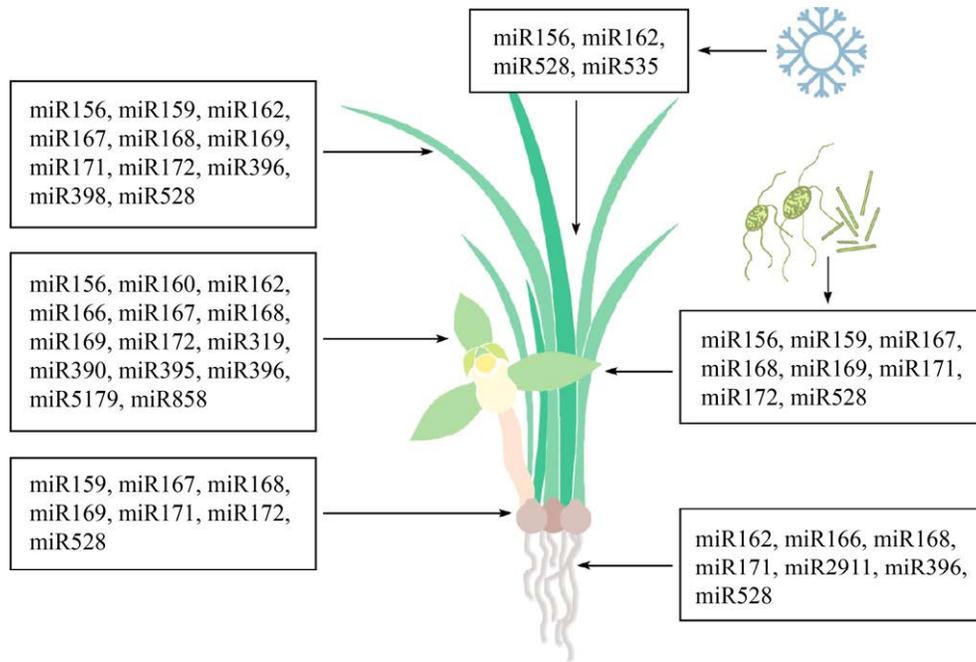


图 1 兰科植物发育过程中几种主要的 miRNA

Figure 1 The major miRNAs involved in the development of orchids.

REFERENCES

- [1] Chung MY, Chung MG. The breeding systems of *Cremastra appendiculata* and *Cymbidium goeringii*: high levels of annual fruit failure in two self-compatible orchids. *Ann Bot Fenn*, 2003, 40(2): 81-85.
- [2] Yukawa T, Stern WL. Comparative vegetative anatomy and systematics of *Cymbidium* (Cymbidieae: Orchidaceae). *Bot J Linn Soc*, 2002, 138(4): 383-419.
- [3] Su CL, Chao YT, Yen SH, et al. Orchidstra: an integrated orchid functional genomics database. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(2): e11.
- [4] Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS*, 2004, 101(34): 12753-12758.
- [5] O'Toole AS, Miller S, Haines N, et al. Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson-Crick terminal base pairs. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(11): 3338-3344.
- [6] Park W, Li JJ, Song RT, et al. Carpel factory, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484-1495.
- [7] 张翠桔, 莫蓓莘, 陈雪梅, 等. 植物 miRNA 作用方式的分子机制研究进展. *生物技术通报*, 2020, 36(7): 1-14.
- [8] Zhang CJ, Mo BX, Chen XM, et al. Advances on the molecular action mechanisms of plant miRNA. *Biotech Bull*, 2020, 36(7): 1-14 (in Chinese).
- [9] Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, et al. A pathway for the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2005, 19(18): 2164-2175.
- [10] Tang GL, Reinhart BJ, Bartel DP, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 49-63.
- [11] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plant. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53.
- [12] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 2008, 320(5880): 1185-1190.
- [13] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [14] Mallory AC, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet*, 2006, 38(S6): S31-S36.
- [15] 吕帝瑾, 赵佳媛, 陈婧, 等. 植物 microRNA 的研究进展. *植物生理学报*, 2013, 49(9): 847-854.

- Lv DJ, Zhao JY, Chen J, et al. Advances in the research of plant microRNA. *Plant Physiol J*, 2013, 49(9): 847-854 (in Chinese).
- [15] 曹慧颖, 王可, 高何瑞, 等. 植物激素相关 microRNA 研究进展. *植物生理学报*, 2013, 49(11): 1121-1126.
- Cao HY, Wang K, Gao HR, et al. Research progress on microRNA involved in phytohormone response and biosynthesis. *Plant Physiol J*, 2013, 49(11): 1121-1126 (in Chinese).
- [16] An FM, Chan MT. Transcriptome-wide characterization of miRNA-directed and non-miRNA-directed endonucleolytic cleavage using degradome analysis under low ambient temperature in *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(10): 1737-1750.
- [17] Wang J, Wang J, Zhang C, et al. Identification of conserved microRNAs and their targets in *Phalaenopsis* orchid. *Russ J Plant Physiol*, 2013, 60(6): 845-854.
- [18] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRbase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2010, 39(S1): D152-D157.
- [19] Chao YT, Su CL, Jean WH, et al. Identification and characterization of the microRNA transcriptome of a moth orchid *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Mol Biol*, 2014, 84(4/5): 529-548.
- [20] Zhao AJ, Cui Z, Li TG, et al. mRNA and miRNA expression analysis reveal the regulation for flower spot patterning in *Phalaenopsis* 'Panda'. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4250.
- [21] Cai J, Liu X, Vanneste K, et al. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nat Genet*, 2015, 47(1): 65-72.
- [22] Huang JZ, Lin CP, Cheng TC, et al. The genome and transcriptome of *Phalaenopsis* yield insights into floral organ development and flowering regulation. *PeerJ*, 2016, 4(10): e2017.
- [23] Meng YJ, Yu DL, Xue J, et al. A transcriptome-wide, organ-specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb. *Sci Rep*, 2016, 6: 18864.
- [24] Yu DL, Wan Y, Ito H, et al. PmiRDiscVali: an integrated pipeline for plant microRNA discovery and validation. *BMC Genomics*, 2019, 20: 133.
- [25] Yang ZL, Yang DF, Ding XF, et al. MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated *Dendrobium officinale*. *Genes Genom*, 2015, 37(4): 315-325.
- [26] Krishnatreya DB, Baruah PM, Dowarah B, et al. Mining of miRNAs from EST data in *Dendrobium nobile*. *Bioinformatics*, 2020, 16(3): 245-255.
- [27] Li XB, Jin F, Jin L, et al. Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of flowering in *Cymbidium ensifolium*. *BMC Genomics*, 2015, 16: 622.
- [28] Yang FX, Zhu GF, Wang Z, et al. Integrated mRNA and microRNA transcriptome variations in the multi-tepal mutant provide insights into the floral patterning of the orchid *Cymbidium goeringii*. *BMC Genomics*, 2017, 18: 367.
- [29] Yang FX, Zhu GF. MicroRNA transcriptome variations in the multi-tepal mutant provide insights into the floral patterning of the orchid *Cymbidium goeringii*. *Acta Hort*, 2018, 1208: 85-95.
- [30] 易绮斐, 刘东明, 陈红锋, 等. 兰花主要病害及其防治. *植物保护*, 2004, 30(1): 71-73.
- Yi QF, Liu DM, Chen HF, et al. Major diseases on *Cymbidium* spp. and their control. *Plant Prot*, 2004, 30(1): 71-73 (in Chinese).
- [31] Samson R, Legendre JB, Christen R, et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 1415-1427.
- [32] Fu SF, Tsai TM, Chen YR, et al. Characterization of the early response of the orchid, *Phalaenopsis amabilis*, to *Erwinia chrysanthemi* infection using expression profiling. *Physiol Plant*, 2012, 145(3): 406-425.
- [33] 王培育, 王丛巧, 张舒婷, 等. 文心兰 25 条 miRNA 前体序列特性及其表达分析. *西北植物学报*, 2018, 38(9): 1587-1597.
- Wang PY, Wang CQ, Zhang ST, et al. Sequences characteristics and expression patterns of 25 miRNA precursors in *Oncidium hybridum*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2018, 38(9): 1587-1597 (in Chinese).
- [34] 王培育, 林争春, 王丛巧, 等. 文心兰 15 个 miRNAs 及其候选靶标的表达特性. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(1): 108-116.
- Wang PY, Lin ZC, Wang CQ, et al. Expression characteristics of 15 miRNAs and their candidate target genes in *Oncidium hybridum*. *Chin J Appl Environ Biol*,

- 2019, 25(1): 108-116 (in Chinese).
- [35] Ye W, Jiang JL, Lin YL, et al. Colonisation of *Oncidium* orchid roots by the endophyte *Piriformospora indica* restricts *Erwinia chrysanthemi* infection, stimulates accumulation of *NBS-LRR* resistance gene transcripts and represses their targeting micro-RNAs in leaves. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 601.
- [36] Lin CS, Chen JJW, Huang YT, et al. Catalog of *Erycina pusilla* miRNA and categorization of reproductive phase-related miRNAs and their target gene families. *Plant Mol Biol*, 2013, 82(1/2): 193-204.
- [37] Aceto S, Sica M, De Paolo S, et al. The analysis of the inflorescence miRNome of the orchid *Orchis italica* reveals a *DEF*-like MADS-box gene as a new miRNA target. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97839.
- [38] Esfeld K, Wesche IHK, Jakob SS, et al. Molecular data indicate multiple independent colonizations of former lignite mining areas in Eastern Germany by *Epipactis palustris* (Orchidaceae). *Biodivers Conserv*, 2008, 17(10): 2441-2453.
- [39] 虞莎, 王佳伟. miR156 介导的高等植物年龄途径研究进展. *科学通报*, 2014, 59(15): 1398-1404.
Yu S, Wang JW. Recent progress in miR156-mediated aging pathway in plants. *Chin Sci Bull*, 2014, 59(15): 1398-1404 (in Chinese).
- [40] Zheng J, Ma YR, Zhang MY, et al. Expression pattern of *FT/TFL1* and miR156-targeted SPL genes associated with developmental stages in *Dendrobium catenatum*. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2725.
- [41] Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*, 2006, 133(18): 3539-3547.
- [42] An FM, Hsiao SR, Chan MT. Sequencing-based approaches reveal low ambient temperature- responsive and tissue-specific microRNAs in *Phalaenopsis* orchid. *PLoS One*, 2011, 6(5): e18937.
- [43] Han YY, Yan QH, Ming F. An effective homologous cloning method for isolating novel miR172s from *Phalaenopsis hybrida*. *Genet Mol Biol*, 2014, 27(2): 414-422.
- [44] Yang FX, Zhu GF, Wang Z, et al. A putative miR172-targeted *CeAPETALA2-like* gene is involved in floral patterning regulation of the orchid *Cymbidium ensifolium*. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 12049-12061.
- [45] Jung JH, Seo PJ, Kang SK, et al. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(1/2): 35-45.
- [46] Wu G, Park MY, Conway SR, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138(4): 750-759.
- [47] Salemme M, Sica M, Iazzetti G, et al. The *AP2*-like gene *OitaAP2* is alternatively spliced and differentially expressed in inflorescence and vegetative tissues of the orchid *Orchis italica*. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77454.
- [48] 罗茂, 张志明, 高健, 等. miR319 在植物器官发育中的调控作用. *遗传*, 2011, 33(11): 1203-1211.
Luo M, Zhang ZM, Gao J, et al. The role of miR319 in plant development regulation. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(11): 1203-1211 (in Chinese).
- [49] De Paolo S, Gaudio L, Aceto S. Analysis of the *TCP* genes expressed in the inflorescence of the orchid *Orchis italica*. *Sci Rep*, 2015, 5: 16265.
- [50] 徐子涵, 刘倩, 苗大鹏, 等. 春兰 miR396 过表达对拟南芥叶片生长、光合及叶绿素荧光特性的影响. *生物技术通报*, 2020, 37(5): 65-74.
Xu ZH, Liu Q, Miao DP, et al. Impacts of *Cymbidium goeringii*'s miR396 overexpression on the leaf growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis thaliana*. *Biotech Bull*, 2020, 37(5): 65-74 (in Chinese).
- [51] Unver T, Bakar M, Shearman RC, et al. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics*, 2010, 283(4): 397-413.
- [52] Rodriguez ER, Mecchia MA, Debernardi JM, et al. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development*, 2010, 137(1): 103-112.
- [53] Wang L, Gu XL, Xu DY, et al. miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2011, 62(2): 761-773.
- [54] Petchthai U, Peng D, Huehne PS. The bias in small RNA profiles between symptomless *Dendrobium* and severe symptom *Ascocenda* orchids infected long-term with *Cymbidium mosaic virus*. *Plant Mol Biol Rep*, 2015, 33(4): 819-828.
- [55] Tsai CC, Chiang YC, Weng IS, et al. Evidence of purifying selection and co-evolution at the fold-back arm of the novel precursor microRNA159 gene in *Phalaenopsis* species (Orchidaceae). *PLoS One*, 2014, 9(12): e114493.

- [56] Yao SZ, Yang ZR, Yang RX, et al. Transcriptional regulation of miR528 by *OsSPL9* orchestrates antiviral response in rice. *Mol Plant*, 2019, 12(8): 1114-1122.
- [57] Liu QP, Hu HC, Zhu LY, et al. Involvement of miR528 in the regulation of arsenite tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40): 8849-8861.
- [58] Yuan SR, Li ZG, Li DY, et al. Constitutive expression of rice *microRNA528* alters plant development and enhances tolerance to salinity stress and nitrogen starvation in creeping bentgrass. *Plant Physiol*, 2015, 169(1): 576-593.
- [59] Millar AA, Lohe A, Wong G. Biology and function of miR159 in plants. *Plants*, 2019, 8(8): 255.
- [60] Tseng KC, Chiang-Hsieh YF, Pai H, et al. microRPM: a microRNA prediction model based only on plant small RNA sequencing data. *Bioinformatics*, 2018, 34(7): 1108-1115.
- [61] Yang XZ, Li L. miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatic*, 2011, 27(18): 2614-2615.
- [62] 赵安瑾, 崔峥, 杨文汉, 等. 蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) miRNA 荧光定量体系的优化. *分子植物育种*, 2018, 16(5): 1566-1572.
- Zhao AJ, Cui Z, Yang WH, et al. Optimization of real-time fluorescence quantitative PCR system for miRNA in *Phalaenopsis amabilis*. *Mol Plant Breeding*, 2018, 16(5): 1566-1572 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)