

DOI:10.12171/j.1000-1522.20190464

胡杨异形叶差异表达 miRNA 及其靶基因功能分析

曾明 何书航 李文海 冯军 赵媛媛 郑彩霞

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】异形叶性是植物为适应环境在同一植株上产生多种形态成熟叶片的现象。胡杨是典型的木本异形叶植物,前人研究发现,胡杨异形叶片间展现出不同的生理特性及环境适应性。本研究拟通过对胡杨异形叶差异表达 miRNA 及其靶基因功能的分析,揭示胡杨叶片形态及其生理变化的分子调控机制。【方法】以成年胡杨披针形叶和锯齿卵圆形叶为实验材料,通过高通量测序对其 miRNA 的表达模式及差异表达 miRNA 的靶基因功能进行比较研究。【结果】共获得 6 个高质量的 sRNA 文库,各文库有效序列占原始序列的 56%~81%。通过比对,共鉴定 517 个已知 miRNA 和 127 个新预测 miRNA,主要长度分布区间为 20~22 nt,其中的 389 个 miRNA 匹配至 54 个已知的 miRNA 家族。两种形态叶片共同检出的 miRNA 有 369 个,与披针形叶片相比,锯齿卵圆形叶中 7 个 miRNA 上调表达,15 个下调表达。通过靶基因预测及功能分析,发现差异表达 miRNA 参与调控胡杨异形叶的抗逆相关途径,如对盐胁迫的响应,磷酸肌醇代谢,角质、软木脂和蜡的生物合成,碱基切除修复和 RNA 降解等代谢途径。利用实时荧光定量 PCR 验证了 5 个差异表达 miRNA 的表达趋势与高通量测序结果一致,通过 PCR 检测发现差异表达 miRNA 与其靶基因存在一定的负调控关系。【结论】胡杨异形叶中 miRNA 表达模式存在差异。其中,调控植物生长发育的保守的 miR167、miR166 及调控植物抗逆性的 miR172 在锯齿卵圆形叶中表达量上调,参与植物逆境响应的保守的 miR169、miR396 在锯齿卵圆形叶中下调表达,推测差异表达 miRNA 引起了异形叶间形态的差异,同时使锯齿卵圆形叶对不利环境具有较强的耐受性。这与我们前期有关胡杨异形叶形态与生理特性的研究结果相一致。

关键词: 胡杨; 异形叶; miRNA; 高通量测序; 差异表达

中图分类号: S718.43; S792.119 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2020)06-0001-13

引文格式: 曾明,何书航,李文海,等. 胡杨异形叶差异表达 miRNA 及其靶基因功能分析 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(6): 1-13. Zeng Ming, He Shuhang, Li Wenhai, et al. Differential expression of miRNA and function of target genes in heteromorphic leaves of *Populus euphratica* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(6): 1-13.

Differential expression of miRNA and function of target genes in heteromorphic leaves of *Populus euphratica*

Zeng Ming He Shuhang Li Wenhai Feng Jun Zhao Yuanyuan Zheng Caixia

(School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Heterophylly is the phenomenon that plants form multiple types of mature leaves on the same plant to adapt to the environment. *Populus euphratica* is a typical woody heterophyllous plant, and previous research found that there were differences between heteromorphic leaves of *P. euphratica* in physiological characteristics and environmental adaptation. In this study, to reveal the molecular regulation of morphological and physiological characteristics in heteromorphic leaves of *P. euphratica*, we analyzed the differential expression of miRNAs and functions of target genes in heteromorphic leaves of *P. euphratica*.

收稿日期: 2019-12-11 **修回日期:** 2020-04-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31700250), 国家自然科学基金项目(31870571)。

第一作者: 曾明, 博士生。主要研究方向: 木本植物生长与发育。Email: zengming1990@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 赵媛媛, 讲师。主要研究方向: 木本植物生长与发育。Email: yzhaoyuan@bjfu.edu.cn 地址: 同上。郑彩霞, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 木本植物生长与发育。Email: zhengcx@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

[Method] In this paper, using high-throughput sequencing, comparative study for miRNA expression patterns and functions of target genes was conducted in lanceolate leaves and dentate broad-ovate leaves. **[Result]** Total of 6 high-quality sRNA libraries were obtained, and the valid sequence of each library accounted for 56%–81% of the raw data. Total 517 known miRNAs and 127 predicted novel miRNAs were identified, the length of which was mainly distributed in 20–22 nt. Besides, 389 of the identified miRNAs were mapped to 54 known miRNA families, and there were 369 miRNAs detected in both two types of leaves. Compared with lanceolate leaves, 7 miRNAs were up-regulated and in dentate broad-ovate leaves, while 15 miRNAs were down-regulated. Based on the prediction of target genes and function annotation, differentially expressed miRNAs were involved in stress-resistant pathways in *Populus euphratica*, such as cellular response to salt stress, inositol phosphate metabolism, cutin, suberine and wax biosynthesis, base excision repair, and RNA degradation pathways. Moreover, expression levels of 5 differentially expressed miRNAs and their corresponding target genes were examined by quantitative real-time PCR, which could confirm the expression profile of the sRNA-sequencing and the negative regulation of miRNAs on their target genes. **[Conclusion]** Our study reveals that the expression patterns of miRNA between the heteromorphic leaves of *P. euphratica* are different. The miR167 and miR166 involved in growth and development of plant and miR172 associated with stress resistance of plant are up-regulated in dentate broad-ovate leaves. Besides, the miR169 and miR396 involved in stress resistance of plant are down-regulated in dentate broad-ovate leaves in comparison to lanceolate leaves. We speculate that the differential expression of miRNA may induce the morphological difference between heteromorphic leaves, and could increase the resistance of dentate broad-ovate leaves to adverse environments, this is consistent with our previous results of morphological and physiological characteristics in heteromorphic leaves of *P. euphratica*. **Key words:** *Populus euphratica*; heteromorphic leaf; miRNA; high-throughput sequencing; differential expression

异形叶性是植物在长期进化过程中, 基于表型可塑性演化出的在同一植株上出现多种形态成熟叶片的现象^[1]。异形叶性在水生植物中较为普遍而陆生植物中相对少见, 如慈姑(*Sagittaria trifolia*)^[2]、黄睡莲(*Nuphar lutea*)^[3]、银杏(*Ginkgo biloba*)^[4]等。植物作为固着生存的生物, 适应环境对其生存至关重要。基于植物异形叶性的形成原因, 异形叶植物成为研究植物响应环境的典型植物。在水蓼衣(*Hygrophila difformis*)对温度响应的研究中, 发现在 20 °C 时产生羽状深裂叶片, 在 26 °C 时产生叶缘完整的单叶^[5]。异形叶植物在响应环境过程中, 不仅外部形态会发生变异, 其内部功能性状也产生适应性变化。对臭柏(*Sabina vulgaris*)的鳞叶和刺叶水分特性的比较研究中发现, 鳞叶的保水及渗透调节能力较强, 适应干旱的能力比刺叶强^[6]。

miRNA 是一类生物体内源存在的非编码 RNA, 一般长度介于 18 ~ 24 nt 之间。miRNA 最早在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中被发现^[7], 随着测序技术及生物信息学的发展, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[8]、玉米(*Zea mays*)^[9]、苔藓^[10]等植物中也发现了各类 miRNA。研究表明, miRNA 通过与靶基因结合, 切割靶基因或抑制靶基因的翻译来对生物

的基因表达进行转录后水平的负调控。由于植物中 miRNA 大多与靶基因目标区域完全互补配对, 所以植物中 miRNA 主要通过切割靶基因来调控编码基因的表达且具有高度保守性^[11]。近年的研究表明, miRNA 能够响应环境的变化对植物基因表达进行调控, 在植物对环境的适应中起到重要作用。耐热性较强的蕹菜(*Ipomoea aquatica*)经高温处理后, miR166 的表达量下降^[12]。水稻(*Oryza sativa*)经干旱处理后, miR164、miR167、miR169、miR319 和 miR398 下调表达, 相关的靶基因也同时表现为差异表达, 表明 miRNA 通过调控靶基因而参与植物的干旱胁迫响应^[13]。对盐胁迫下胡杨(*Populus euphratica*)miRNA 表达分析发现 miR156、miR157、miR165、miR166 和 miR167 的表达量提高, 表明这些 miRNA 及其靶基因可能参与胡杨的盐胁迫响应过程^[14]。

胡杨属于杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*), 是干旱荒漠区重要的建群树种, 具有较强的耐盐耐旱性, 其异形叶性是胡杨环境适应性的表现。成年胡杨植株从树冠底部到顶部分布有披针形叶、卵圆形叶、锯齿卵圆形叶及其他过渡态叶片^[15], 各形态叶片不仅结构存在明显差异, 其生理特性, 如光合作用、

水分生理、抗氧化酶活性等也存在显著差异。研究表明, 锯齿卵圆形叶的抗氧化能力较披针形叶强, 具有较强的抗逆性^[16], 较强的光合能力, 比披针形叶更适应冠层上部的高光强环境^[17], 其饱和膨压渗透势和零膨压渗透势都小于披针形叶, 具有较好的渗透调节能力, 较适应干旱环境^[18]。此外针对胡杨异形叶蛋白质组学的研究发现, 与光合等相关的蛋白质在披针形叶和锯齿卵圆形叶中差异表达, 表明胡杨生理特性的差异是通过其编码基因的差异表达来实现的^[19]。

胡杨作为典型的木本异形叶植物, 是研究植物环境适应性的良好实验材料。前期研究发现其具代表性的披针形叶和锯齿卵圆形叶在结构, 生理特性, 蛋白表达方面存在差异。虽有人对盐胁迫后胡杨幼苗中 miRNA 的表达进行了分析^[14], 但对于胡杨异形叶的 miRNA 表达特征的研究尚未见报道。本文以胡杨披针形叶和锯齿卵圆形叶为材料, 利用高通量测序和生物信息学分析技术, 对差异表达 miRNA 及其靶基因功能进行分析, 以揭示胡杨叶片形态及其生理变化的分子调控机制。

1 实验材料和研究方法

1.1 实验材料

本实验选用的典型的披针形和锯齿卵圆形成熟叶, 分别取自于生长在北京林业大学苗圃的 3 株健康成年胡杨(树龄 30 年, 株高 9 m, 胸径 17 cm)的冠层下部和上部。将采集的叶片立即清理干净, 每种形态叶各 3 份, 迅速置于液氮中速冻后于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 RNA 提取、小 RNA 文库建立及高通量测序

利用 Trizol 法分别提取披针形叶和锯齿卵圆形叶的总 RNA, 每种叶片 3 个生物学重复, 使用 Nanodrop 对总 RNA 纯度进行质检。文库制备采用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits(Illumina, San Diego, USA)试剂盒, 使用 T4 RNA 连接酶分别于 small RNAs'端和 3'端连上接头, 随后进行反转录反应, 对反转录产生的 cDNA 序列进行 PCR 扩增。最后, 对 140 ~ 160 bp 长度范围的 PCR 产物进行胶回收, 完成文库制备。对构建好的文库使用 Illumina HiSeq2500 测序, 测序读长为单端 1 × 50 bp。

1.3 数据质控及过滤

原始序列通过 Illumina FastQC 进行数据质量评估, 获取 Q30 数据后, 将由于样本制备、测序接头、非典型 miRNA 特征序列以及测序仪器光学数码处理而产生的非纯序列(N 特征序列)进行清理。随后, 进行长度筛选, 保留碱基长度在 18 ~ 25 nt 的序

列, 再将剩余序列与各种 RNA 数据库序列(不包含 miRNA), 如 mRNA、RFam(包含 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等)和重复序列数据库(rebase)进行比对并过滤。

1.4 miRNA 的鉴定

利用 Bowtie 软件将过滤后的小 RNA 有效序列与 miRBase21.0 数据库中胡杨 miRNA 成熟体和前体序列进行同源比对, 鉴定样品中的已知 miRNA。对未匹配上注释信息的小 RNA 进行新 miRNA 的预测, 使用 RNAfold 软件对目标 RNA 位点的上下游分别延伸的 120 nt 长度的序列进行二级结构预测, 同时通过 Mireap 软件进行评测, 筛选二级折叠结构严格符合 miRNA 前体特征的序列作为预测的新 miRNA。

1.5 差异表达 miRNA 筛选及其靶基因预测

基于鉴定的 miRNA 在各样本文库的相对表达丰度, 利用 DEGseq 和 DESeq R 语言包进行差异表达 miRNA 的筛选, 筛选条件设置为 $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ (即表达差异倍数大于 2), $P < 0.05$ 。运用 TargetFinder 对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测^[20]。

1.6 靶基因的 GO 及 KEGG 分析

依据生物过程, 所处细胞位置, 分子功能 3 种 GO 类别, 利用 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)对差异 miRNA 的靶基因进行 GO 功能注释。采用超几何分布检验对差异 miRNA 的靶基因进行 GO 富集分析。此外, 利用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)对差异 miRNA 的靶基因进行代谢途径(pathway)注释, 并应用超几何分布检验进行差异 miRNA 靶基因富集代谢途径的显著性检验。

1.7 差异表达 miRNA 和靶基因的实时荧光定量 PCR 检测

使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根)提取胡杨异形叶总 RNA。采用茎环引物反转录法(stem-loop RT)实时荧光定量 PCR 对差异表达 miRNA 进行表达量验证。采用实时荧光定量 PCR 对靶基因进行表达量检测。选取 HIS 和 RP 为内参基因^[21], 使用 Bio-Rad Mini Opticon 荧光定量 PCR 仪进行扩增。扩增条件设置为: 95 °C 5 min 预变性, 随后 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 35 个循环。所有反应均进行 3 次重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算各样本相对表达量, 式中, C_T 为阈值循环数^[22]。

2 结果与分析

2.1 胡杨异形叶 miRNA 测序结果统计

应用高通量测序技术, 分别对胡杨披针形叶(lanceolate leaf)和锯齿卵圆形叶(dentate broad-ovate

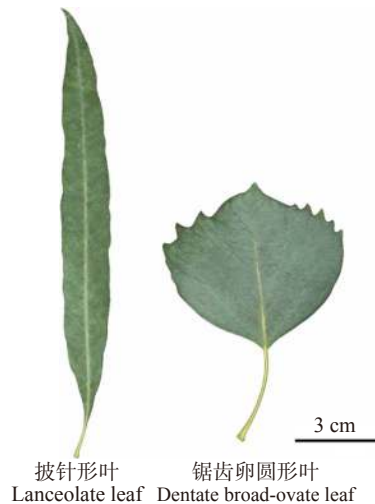


图1 胡杨两种典型异形叶

Fig. 1 Two representative types of heteromorphic leaves in *P. euphratica*

leaf)(图1)进行小RNA测序,每种叶片3个重复,共构建6个小RNA文库。如表1所示,各文库获得总原始读段(total raw reads)的数量为9 811 531 ~

10 994 672 条,唯一原始读段(unique raw reads)为830 479 ~ 1 813 462 种。对数据去除测序接头、垃圾序列,并过滤掉比对至 mRNA 数据库, Rfam(包含 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等)数据库和重复序列数据库(repbase)的序列。最终获得 6 008 394 ~ 8 333 317 条总有效读段(total valid reads),约占总原始读段(total raw reads)的 56% ~ 81%。其中得到 527 874 ~ 1 130 544 种唯一有效读段(unique valid reads),约占唯一原始读段(unique raw reads)的 53% ~ 74%。进一步对总有效读段(total valid reads)以及唯一有效读段(unique valid reads)长度分布统计。如图 2A 所示,其中长度为 21 nt 的读段数量较多,约占总有效读段(total valid reads)的 30%,而长度为 21 与 24 nt 的读段种数较多,分别约占有唯一有效读段(unique valid reads)的 20%(图 2B)。大部分胡杨异形叶 miRNA 序列长度分布在 20 ~ 24 nt,符合 Dicer 酶切割的典型特征,可对所得的有效序列进行下一步的 miRNA 鉴定分析。

表1 胡杨异形叶小RNA测序统计

Tab. 1 sRNA sequencing data from heteromorphic leaves in *P. euphratica*

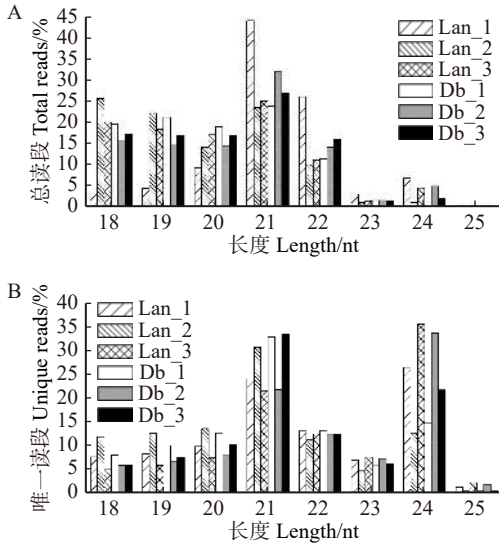
文库 Library	Lan_1	Lan_2	Lan_3	Db_1	Db_2	Db_3
总原始读段 Total raw reads	10 994 672	10 095 826	9 811 531	9 849 631	10 445 363	10 587 269
唯一原始读段 Unique raw reads	1 813 462	991 857	999 928	830 479	1 096 378	921 232
总3ADT及长度筛选 Total 3ADT & length filter	4 491 129	3 357 910	1 750 389	1 604 935	4 096 241	1 930 624
总垃圾读段 Total junk reads	28 511	11 988	15 331	15 505	12 559	16 490
总Rfam Total Rfam	168 570	95 671	79 962	93 630	53 066	112 629
总mRNA Total mRNA	300 609	128 948	131 286	148 439	143 075	196 224
总重复序列 Total repeats	4 002	1 575	1 600	1 779	1 519	1 740
总有效读段 Total valid reads	6 008 394 (54.65%)	6 502 632 (64.41%)	7 835 125 (79.86%)	7 988 626 (81.11%)	6 140 459 (58.79%)	8 333 317 (78.71%)
唯一有效读段 Unique valid reads	1 130 544 (62.34%)	527 874 (53.22%)	745 979 (74.6%)	589 777 (71.02%)	664 491 (60.61%)	658 041 (71.43%)

注: Lan为披针形叶; Db为锯齿卵圆形叶。下同。Notes: Lan is lanceolate leaves; Db, dentate broad-ovate leaves. The same below.

2.2 miRNA 的比对及预测

将过滤筛选后获得有效序列与 miRBase 21.0 数据库中的胡杨及近缘物种的 miRNA 成熟体和前体序列进行比对。如表 2 所示,以胡杨作为首选物种,共鉴定得到 517 个已知 miRNA。根据比对的匹配程度分为 3 个组别(group 1、group 2、group 3),其中 group 1(4 个)是胡杨中已报道的 miRNA; group 2(513 个)是在其他近缘物种中已报道的 miRNA; group 3 中筛选得到的 127 个 miRNA 为新预测 miRNA。依据植物 miRNA 的 5' 端第 1 个碱基对

U 有较强的偏好性而对 G 则有抗性的特征,对检出的所有 miRNA 进行 U 碱基偏好性分析。如图 3a 所示,U 碱基在第 1 位碱基中占比最高,约占 55%,也远高于其他位次碱基中 U 碱基所占比例。而 G 在第 1 位碱基中所占比例最低,仅占 10%,该比例也明显低于其他位次碱基中 G 碱基所占比例,表明胡杨异形叶中检测得到的 miRNA 符合植物 miRNA 的碱基偏好性特征,匹配结果准确可靠。此外进一步的家系分析发现,有 389 条序列能够匹配到 54 个已知的 miRNA 家族,并且匹配序列数超过 10 的 miRNA



A. 总有效序列的长度分布; B. 有效序列种类的长度分布。A, length distribution of total valid reads; B, length distribution of unique valid reads.

图 2 胡杨异形叶小 RNA 测序的有效序列长度分布统计

Fig. 2 Length distribution of valid reads from sRNA sequencing for heteromorphic leaves in *P. euphratica*

表 2 胡杨异形叶 miRNA 鉴定统计

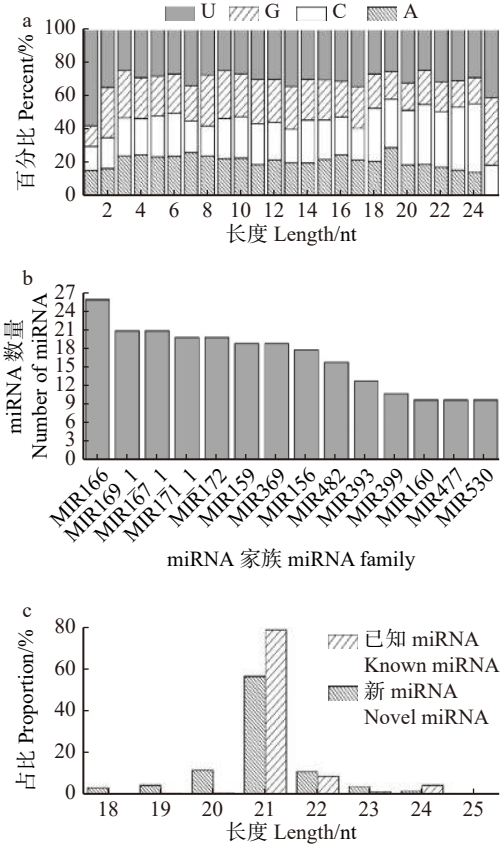
Tab. 2 Statistics of miRNA identification in heteromorphic leaves of *P. euphratica*

组别 Group	Lan_1	Lan_2	Lan_3	Db_1	Db_2	Db_3	总数 Total
组1 Group 1	3	4	3	3	3	4	4
组2 Group 2	466	409	409	413	409	419	513
组3 Group 3	114	79	97	98	90	97	127

家族有 14 个(图 3b)。其中 MIR166 家族匹配到的成员数最多, 为 26 个, 其次是 MIR169_1 和 MIR167_1 家族, 各匹配到 21 个成员。对鉴定的已知 miRNA 和新发现 miRNA 的长度进行统计, 结果显示 miRNA 长度峰值在 21 nt。其中, 已知 miRNA 长度分布在 18~25 nt, 主要分布于 20~22 nt 区间; 新发现 miRNA 长度在 19~24 nt, 主要分布于 21~23 nt 区间(图 3c)。

2.3 差异 miRNA 鉴定

基于 miRNA 比对结果, 对 miRNA 在两种异形叶中的表达进行统计。通过维恩图分析(图 4A、4B)可知, 在披针形叶片组内鉴定出 419 个 miRNA, 在锯齿卵圆形叶片组内鉴定出 411 个 miRNA。在两种异形叶中共同检出的 miRNA 数量为 369 个。此外 50 个 miRNA 在披针形叶中特异性表达, 42 个 miRNA 在锯齿卵圆形叶中特异性表达(图 4C)。基于 miRNA 在各样本中的表达丰度进行 miRNA 差异表达分析, 结果发现共有 22 个 miRNA 在披针形叶



a. 胡杨异形叶 miRNA 碱基偏好性分析; b. 胡杨异形叶 miRNA 家族统计; c. 胡杨异形叶小 RNA 测序鉴定的已知 miRNA 及新发现 miRNA 的长度分布。a, miRNA nucleotide bias analysis of heteromorphic leaves in *P. euphratica*; b, miRNA family statistics of heteromorphic leaves in *P. euphratica*; c, length distribution of known miRNAs and novel miRNAs identified from sRNA sequencing for heteromorphic leaves in *P. euphratica*.

图 3 胡杨异形叶中 miRNA 统计分析

Fig. 3 Statistical analysis of miRNA identified in heteromorphic leaves of *P. euphratica*

与锯齿卵圆形叶中差异表达, 其中包括植物中保守的 miR167、miR172、miR166、miR169、miR168、miR160 等。与披针形叶相比, miR167、miR172、miR166 等 7 个 miRNA 在锯齿卵圆形叶中上调表达, miR169、miR168、miR160 等 15 个 miRNA 下调表达(图 4D)。

2.4 靶基因的 GO 注释

miRNA 通过对靶基因表达的调控来影响植物的各项生命活动, 为揭示 miRNA 在胡杨异形叶中的作用, 本研究采用 TargetFinder 软件对胡杨异形叶中差异表达的 miRNA 进行靶基因预测, 并利用 GO 数据库信息对差异 miRNA 的靶基因进行功能注释。基于 GO 三类本体的分类, 如图 5 所示, 在生物过程 (biological_process) 大类中, 异形叶差异 miRNA 的靶基因主要分布在生物过程 (29 个), 转录调控 -DNA 模板 (regulation of transcription, DNA-templated) (24 个), 转录 -DNA 模板 (transcription,

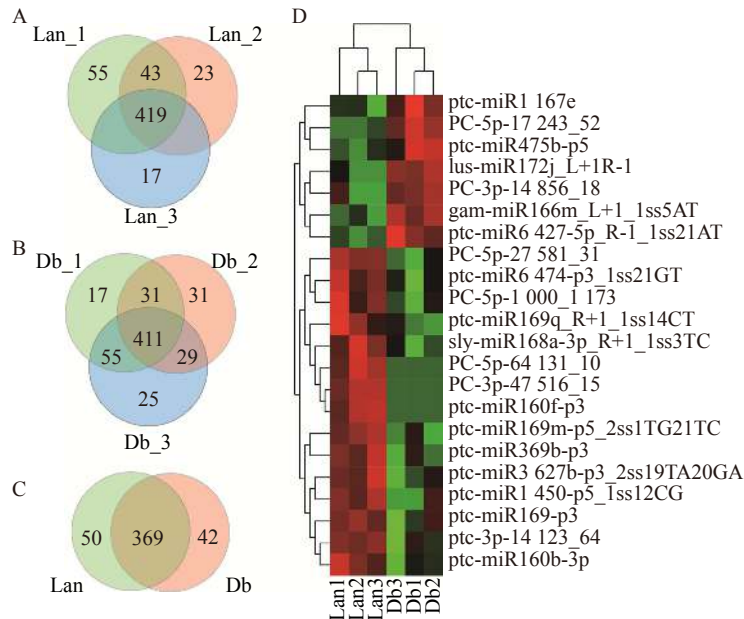


图 4 胡杨异形叶 miRNA 检测的韦恩图及差异表达 miRNA。A, Venn diagram of miRNA detected in lanceolate leaves; B, Venn diagram of miRNA detected in dentate broad-ovate leaves; C, Venn diagram of miRNA detected in dentate broad-ovate leaves vs lanceolate leaves group; D, differentially expressed miRNAs in dentate broad-ovate leaves vs lanceolate leaves group. Lan, lanceolate leaves; Db, dentate broad-ovate leaves.

图 4 胡杨异形叶 miRNA 检测的韦恩图及差异表达 miRNA

Fig. 4 Venn diagram of miRNA detected and differentially expressed miRNAs in heteromorphic leaves of *P. euphratica*

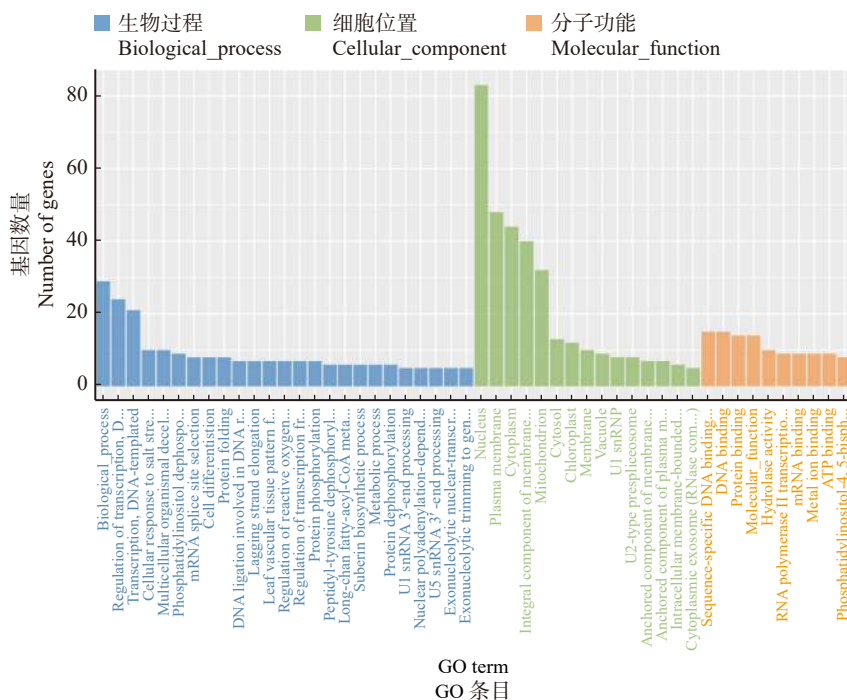


图 5 胡杨异形叶中差异 miRNA 靶基因的 GO 注释

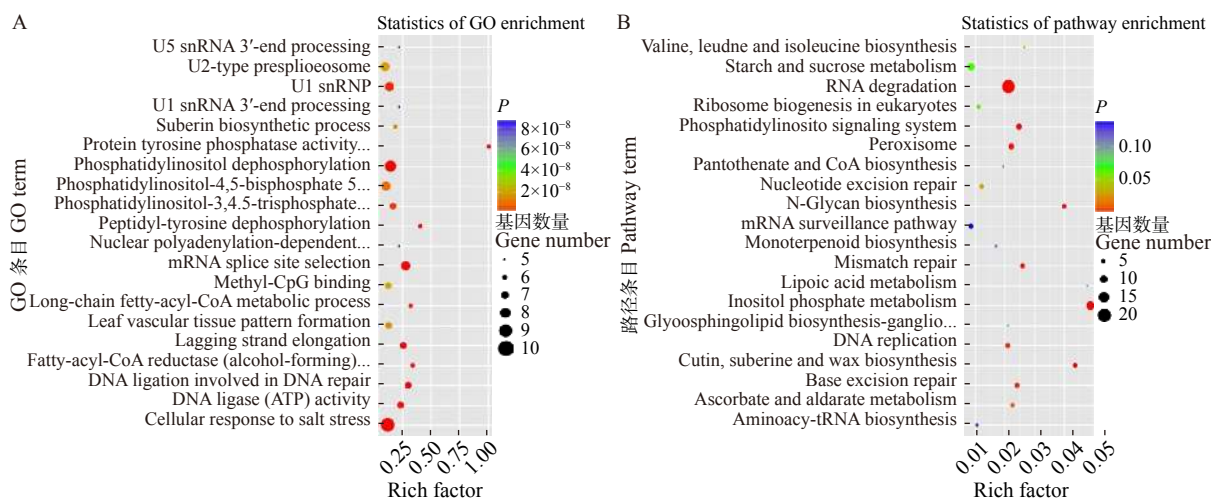
Fig. 5 GO annotation of genes targeted by differentially expressed miRNA in heteromorphic leaves of *P. euphratica*

DNA-templated)(21 个)等 GO 条目中。在所处的细胞位置(cellular component)大类中, 差异 miRNA 的靶基因聚集在细胞核(nucleus)(83 个), 质膜(plasma membrane)(48 个), 细胞质(cytoplasm)(44 个)等 GO 条目中。对于分子功能(molecular_function)大类, 差异 miRNA 的靶基因集中在序列特异性 DNA

结合转录因子活性(sequence-specific DNA binding transcription factor activity)(15 个), DNA 结合(DNA binding)(15 个), 蛋白结合(protein binding)(14 个)等条目中。

2.5 靶基因的 GO 及 KEGG 富集分析

为找出差异 miRNA 的靶基因中显著富集的 GO



A. 差异 miRNA 靶基因的 GO 富集性分析; B. 差异 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集性分析。A, analysis of GO enrichment of genes targeted by differentially expressed miRNAs; B, analysis of KEGG pathway enrichment of genes targeted by differentially expressed miRNAs.

图 6 差异 miRNA 靶基因的 GO 及 KEGG 通路富集性分析

Fig. 6 Analysis of GO enrichment and KEGG pathway enrichment of genes targeted by differentially expressed miRNAs

条目, 本研究对异形叶差异 miRNA 靶基因进行 GO 富集分析。如图 6A 所示, 差异 miRNA 的靶基因主要富集于细胞对盐胁迫的响应 (cellular response to salt stress), 磷脂酰肌醇脱磷酸作用 (phosphatidylinositol dephosphorylation), mRNA 剪接位点选择 (mRNA splice site selection) 等 GO 条目。为进一步阐明差异 miRNA 的靶基因主要参与的代谢途径, 对异形叶差异 miRNA 靶基因进行了 KEGG 通路富集性分析, 发现差异 miRNA 的靶基因主要参与 RNA 降解 (RNA degradation), 磷酸肌醇代谢 (inositol phosphate metabolism), 角质、软木脂和蜡的生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis), 碱基切除修

复 (base excision repair) 等代谢途径 (图 6B)。这些结果表明胡杨异形叶中的差异 miRNA 可能通过调控参与以上过程的靶基因的表达来影响异形叶发育及响应环境。

2.6 异形叶发育及环境响应相关靶基因

异形叶差异 miRNA 的靶基因中包含各类与发育及环境响应相关的转录因子及关键基因。如表 3 所示, 锯齿卵圆形叶中下调表达的 miR169 参与调控 3 个核转录因子 Y (XM_011048135.1、XM_011048134.1、XM_011048132.1) 和两个 GATA 转录因子 (XM_011024766.1、XM_011024764.1) 的表达。下调表达的 miR396 能够调控 F-box 蛋白 (XM_011046985.1)

表 3 植物发育及环境响应相关的靶基因

Tab. 3 Target genes involved in plant development and environmental response

差异 miRNA Differentially expressed miRNA	差异表达 Differential expression	靶基因登录号 Accession No. of target gene	靶基因功能注释 Annotation of target gene
ptc-MIR169s-p3	下调 Down-regulated	XM_011048135.1, XM_011048134.1, XM_011048132.1	核转录因子 Y Nuclear transcription factor Y
		XM_011024766.1, XM_011024764.1	GATA 转录因子 GATA transcription factor
ptc-MIR396b-p3	下调 Down-regulated	XM_011046985.1	F-box 蛋白 F-box protein
ptc-miR167e	上调 Up-regulated	XM_011030586.1, XM_011030585.1, XM_011030587.1, XM_011026286.1	bHLH 转录因子 bHLH transcription factor
		XM_011027709.1, XM_011027715.1, XM_011027701.1, XM_011023286.1, XM_011023287.1	E3 泛素蛋白连接酶 E3 Ubiquitin-protein ligase
ptc-MIR1450-p5_1ss12CG	下调 Down-regulated	XM_011028646.1, XM_011028647.1	阳离子质子反向运输载体 Cation/H ⁽⁺⁾ antiporter
		XM_011033752.1, XM_011047107.1, XM_011047106.1	ABC 转运蛋白 ABC transporter
		XM_011036267.1	热休克蛋白 Heat shock protein
ptc-MIR3627b-p3_2ss19TA20GA	下调 Down-regulated	XM_011044984.1	NAC 转录因子 NAC transcription factor

的表达。此外, miR167 的靶基因中包含 4 个 bHLH 转录因子(XM_011030586.1、XM_011030585.1、XM_011030587.1、XM_011026286.1)和 5 个 E3 泛素蛋白连接酶(XM_011027709.1、XM_011027715.1、XM_011027701.1、XM_011023286.1、XM_011023287.1)。miR1450 参与调控 2 个阳离子质子反向运输载体(XM_011028646.1、XM_011028647.1), 3 个 ABC 转运蛋白(XM_011033752.1、XM_011047107.1、XM_011047106.1)及热休克蛋白(XM_011036267.1)的表达。下调表达的 miR3627 可调控 NAC 转录因子(XM_011044984.1)的表达, 影响植物的抗逆性。以上各类转录因子及关键基因在植物响应逆境及发育调控过程中发挥重要作用, 表明异形叶中差异表达 miRNA 能够通过靶基因的调控影响异形叶的生长发育过程及环境响应能力。

2.7 差异 miRNA 及靶基因表达量的 qRT-PCR 检测

为验证 sRNA-seq 结果的可靠性, 利用茎环反转录法设计引物(表 4), 并通过实时荧光定量 PCR 对胡杨异形叶差异表达 miRNA 及对应靶基因进行表达量检测。如图 7A 所示, ptc-miR167e、lus-miR172j_

L+1R-1、ptc-miR169q_R+1_1ss14CT、ptc-miR160b-3p、ptc-MIR6474-p3_1ss21GT 在披针形叶和锯齿卵圆形叶中的表达趋势与高通量测序结果(图 4D)相似, 说明本次测序结果真实度较高。此外, 对应的靶基因与以上差异表达 miRNA 在两种叶片中呈现出相反的表达趋势(图 7), 表明以上差异表达 miRNA 可能通过抑制相关靶基因的表达来参与调控异形叶形态及其生理特性。

3 讨论与结论

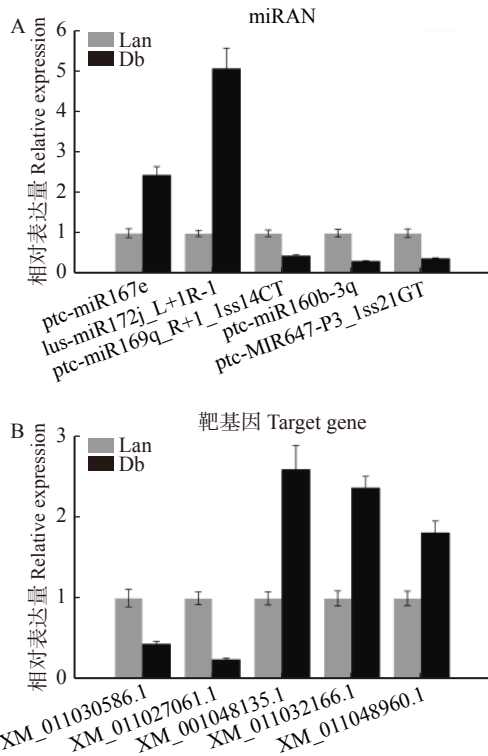
3.1 胡杨异形叶 miRNA 的差异表达及其靶基因的功能

异形叶性是植物基于表型可塑性在响应环境过程中形成的特殊现象, 在植物对微环境适应以及资源利用中发挥重要的作用^[1]。前期的研究表明, 异形叶形态和功能特性的差异与其对所处不同微环境的适应密切相关^[6,23-24], 而这些差异源于编码基因转录水平的差异表达。miRNA 作为内源非编码 RNA 能够在转录水平对植物的基因表达进行调控, 通过抑制靶编码基因的表达来参与植物的生长发育和环境响应^[25]。本文通过 sRNA 高通量测序, 建立了本本

表 4 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 4 Primer sequence for quantitative real-time PCR

miRNA/mRNA	序列 Sequence (5'-3')
miRNA	AGCAGGGTCCGAGGTATTC
ptc-miR167e	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGATC
ptc-miR167e	CCGCGTGAAGCTGCCAGCAT
lus-miR172j_L+1R-1	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGAAT
lus-miR172j_L+1R-1	CCGCGTGCAGCATCATCAAG
ptc-miR169q_R+1_1ss14CT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGGC
ptc-miR169q_R+1_1ss14CT	CCAGGCTAGCCAAGGACGATTT
ptc-miR160b-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTATGCA
ptc-miR160b-3p	CCAGCGTG GCGTATGAGGAGC
ptc-MIR6474-p3_1ss21GT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGTG
ptc-MIR6474-p3_1ss21GT	CCAGTCGACTATCTACGG
XM_011030586.1	GATTTAGTGAAGTTTTCGG
XM_011030586.1	TAGCCTCTGTTCATTTTCATTG
XM_011027061.1	ATGACGACGAGCACCCAA
XM_011027061.1	CCATCTCAGACAATCCCTTT
XM_011048135.1	CTGTTTCAGGGAGCCATTT
XM_011048135.1	CCATCATTCAACTCTTTTCGT
XM_011032166.1	CCAGGCATTGTTTATTCGG
XM_011032166.1	CCACAGTTGGGACATCAAGTATTA
XM_011048960.1	AGTTAGTTTCAGAGGGTTGTG
XM_011048960.1	CTTGTGGCAGCCATGTAG



A. 差异 miRNA 的表达量分析; B. 差异 miRNA 的靶基因的表达量分析。图中误差棒表示平均值的标准偏差。A, analysis of expression level of the differentially expressed miRNAs; B, analysis of expression level of the target genes of differentially expressed miRNAs. Error bars show standard deviation of the average value.

图 7 胡杨异形叶差异表达 miRNA 及靶基因的表达量分析

Fig. 7 Analysis of expression levels of the differentially expressed miRNAs and their target genes in heteromorphic leaves of *P. euphratica*

异形叶植物胡杨的披针形叶和锯齿卵圆形叶 sRNA 文库(表 1), 共鉴定获得 517 个已知 miRNA(表 2), 分别属于 MIR166、MIR169_1、MIR167_1 等 54 个 miRNA 家族中(图 3b)。这些结果表明胡杨异形叶中广泛存在各类保守 miRNA, 可能对异形叶形态和生理特性起着重要的调控作用。

在植物对环境响应的过程中, miRNA 能够通过调控靶基因来影响植物的生理功能。本研究共鉴定获得 22 个在披针形叶和锯齿卵圆形叶中差异表达 miRNA。基于对差异 miRNA 进行靶基因预测及靶基因的 GO 和 KEGG 功能分析, 我们发现这些靶基因主要参与细胞对盐胁迫的响应 (cellular response to salt stress), 磷酸肌醇代谢 (inositol phosphate metabolism), 角质、软木脂和蜡的生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis), 碱基切除修复 (base excision repair) 等植物逆境响应过程(图 6), 表明胡杨异形叶差异表达 miRNA 通过调控对环境适应相关靶基因的表达, 影响不同形态叶片的抗逆性。这些分析结果与前期胡杨异形叶抗逆性的研究一致[16,26-28]。磷酸肌醇代谢与植物响应胞外刺激及信号转导过程密切相关[29]。本研究发现, 差异表达

miRNA 通过调节其靶基因参与调控磷酸肌醇代谢过程, 引起两种形态叶对环境适应性的差异。表皮蜡质有利于植物叶片减少水分散失并抵御强光损伤[30]。之前研究发现胡杨的锯齿卵圆形叶比披针形叶具有更厚的蜡质层[31]。我们的研究发现, 差异 miRNA 的靶基因在角质、软木脂和蜡的生物合成代谢途径中富集, 由此推测胡杨 miRNA 的差异表达可能是引起胡杨锯齿卵圆形叶片蜡质层增厚的原因, 从而使处于冠层上部的锯齿卵圆形叶适应其相对高光强及水分限制的微环境。碱基切除修复主要参与修复逆境对植物造成的 DNA 损伤, 维持植物在逆境下遗传物质的稳定性[32]。本研究中, 差异 miRNA 的靶基因在碱基切除修复途径存在富集, 表明两种形态叶对 DNA 损伤的修复能力存在差异, 锯齿卵圆形叶在逆境胁迫中能够较好地维持 DNA 的稳定性。胡杨不仅具有较强的抗旱性, 还对盐胁迫有一定耐受性[33]。本研究中差异表达 miRNA 的靶基因在盐胁迫的响应功能中富集, 推测锯齿卵圆形叶和披针形叶的耐盐性可能存在差异。

3.2 保守 miRNA 参与调控异形叶生长发育及环境响应

由于植物 miRNA 与靶基因结合区具有严格的序列互补性, 所以植物 miRNA 具有功能保守性。研究发现, 一些保守的 miRNA 在不同植物的生长调节及环境响应过程中具有相似的作用[34]。譬如, miRNA167 能够参与调控植物形态发育过程, 过表达水稻 miR167 能够使植株矮化并增大其分蘖角度[35]。本研究发现, 与披针形叶相比, miR167 在锯齿卵圆形叶中上调表达, 推测 miR167 可能参与了调控胡杨异形叶的形态发育过程。此外, 有研究报道 miR166 能够调控叶片的极性建成, 最终影响叶片的形态[36]。我们的结果发现胡杨两种形态的叶片中 miR166 的表达存在差异, 表明 miR166 可能影响了胡杨异形叶极性建成等叶片发育过程。因此, 我们推测胡杨披针形叶和锯齿卵圆形叶显著差异的叶片形态(图 1)可能与调控叶片发育的 miR167 和 miR166 在两种叶片中差异表达有关。

前期的研究表明, 为了适应冠层上部相对水分亏缺的环境, 胡杨锯齿卵圆形叶相对其他形态叶具有较好的抗旱性[18]。研究发现, miR172 是一类能够响应水分亏缺的植物保守 miRNA, 过表达拟南芥 miR172 能够增强转基因植株对缺水条件的耐受性, 减轻其生长受抑制的情况[37]。此外, 大豆 miR172 也参与植株的水分亏缺的应答, 过表达大豆 miR172 能增强其植株的抗旱性[38]。本研究发现, miR172 在胡杨锯齿卵圆形叶中上调表达(图 4D), 表明 miR172

上调表达可能使锯齿卵圆形叶具有相对较好的抗旱保水能力。miR169 参与植物对水分亏缺的应答,在对玉米^[39]和水稻^[13]研究中发现,植株在水分限制条件下叶片 miR169 呈现下调趋势。我们的结果发现,与披针形叶相比,miR169 在锯齿卵圆形叶的表达量下调,表明 miR169 在胡杨锯齿卵圆形叶应对水分亏缺条件中起着重要作用。由于生长于冠层上部,自然光照射强度较大,通常锯齿卵圆形叶片温度也高于中下部的叶片温度^[26],其对高温的耐受程度也优于披针形叶^[28]。miR396 参与植物的高温胁迫响应,在高温处理下,水稻中的 miR396b 呈现下调表达以应对高温环境^[40]。本研究发现,miR396 在锯齿卵圆形叶中的表达量低于披针形叶,可能与胡杨异形叶响应不同冠层温度有关。综上,差异表达 miRNA 可能是披针形叶和锯齿卵圆形叶之间形态差异的原因,同时也是两种形态叶表现出抗逆性强弱不同的潜在机制。与披针形叶相比,锯齿卵圆形叶更好地适应冠层上部相对水分亏缺和高温的环境。这与我们前期有关胡杨异形叶形态与生理特性的研究结果相一致。

3.3 差异 miRNA 的靶基因参与胡杨抗逆及异形叶发育

胡杨异形叶差异 miRNA 能够调控各类转录因子及重要功能基因,影响胡杨的抗逆性及异形叶发育。核转录因子 Y 是参与调控植物逆境响应的重要转录因子,研究表明毛果杨核转录因子 Y 能够增强植株对非生物胁迫的耐受性^[41]。在胡杨的研究中也发现,在胡杨叶片中表达的核转录因子 Y 参与植株对干旱胁迫的响应^[42]。本研究中,锯齿卵圆形叶中下调表达的 miR169 参与调控 3 个核转录因子 Y(XM_011048135.1、XM_011048134.1、XM_011048132.1)的表达(表 3),表明该形态叶具有较好的对抗干旱胁迫的能力。GATA 转录因子是一类具有锌指结构的转录因子,相关研究在杨树(*Populus spp.*)中证明其能够调控植株的光合作用^[43]。本研究中,两个 GATA 转录因子(XM_011024766.1、XM_011024764.1)受到 miR169 的调控(表 3),能够参与胡杨异形叶光合作用的调控,使不同形态异形叶光合能力存在差异。F-box 蛋白参与植物对逆境的响应,在胡杨的研究中发现,F-box 能够受盐处理、高温、干旱等诱导,且过表达 F-box 能够提高胡杨的耐逆性^[44]。本研究发现,锯齿卵圆形叶中下调表达的 miR396 参与调控 F-box 基因(XM_011046985.1)的表达(表 3),能够使锯齿卵圆形叶中 F-box 基因具有较高表达量,进而使该形态叶片具有较好的抗逆性。bHLH 转录因子在植物的生长发育过程中发挥重要作用,早期

研究表明其参与调控拟南芥和水稻的细胞伸长和发育过程^[45]。随后,在胡杨的研究中发现,胡杨 bHLH 转录因子参与调控植株气孔发育和光合作用^[46]。本课题组前期关于胡杨异形叶的研究发现胡杨不同异形叶片气孔特征和光合特性存在差异^[26]。本研究中,4 个 bHLH 转录因子(XM_011030586.1、XM_011030585.1、XM_011030587.1、XM_011026286.1)作为锯齿卵圆形叶中上调表达的 miR167 的靶基因(表 3),能够参与调控胡杨异形叶气孔发育及光合作用,导致不同异形叶在气孔特征和光合能力的差异。E3 泛素蛋白连接酶在非生物胁迫的信号传递中具有重要作用,早先的研究表明胡杨 E3 泛素蛋白连接酶的表达量影响植株对干旱胁迫响应能力^[47]。近期有研究通过在木本植物中的遗传转化实验,证明了胡杨 E3 泛素蛋白连接酶参与调控植株的抗旱性^[48]。本研究发现,miR167 的靶基因包含 5 个 E3 泛素蛋白连接酶基因(XM_011027709.1、XM_011027715.1、XM_011027701.1、XM_011023286.1、XM_011023287.1)(表 3),表明其可能通过对 E3 泛素蛋白连接酶的调控影响胡杨不同异形叶的抗旱性。

一些非保守的差异表达 miRNA 也参与调控转录因子及重要功能基因,进而调控胡杨异形叶的抗逆性。胡杨具有较好的耐盐性,主要通过阳离子质子反向运输载体将吸收的盐离子于液泡中进行区隔化,避免盐离子对细胞质的损害^[49]。近年来,相关研究也证明了胡杨阳离子质子反向运输载体在盐离子区隔化及增强植株耐盐性中的重要作用^[50-51]。本研究中,锯齿卵圆形叶中下调表达的 miR1450 参与调控两个阳离子质子反向运输载体(XM_011028646.1、XM_011028647.1)(表 3)的表达,能够使锯齿卵圆形叶具有较好的盐离子区隔化能力,增强其耐盐性。ABC 转运蛋白参与植物次生代谢物的跨膜转运,其在植物表皮蜡的转运过程中发挥重要作用^[52]。植物表皮蜡有利于植株抵御干旱、强光等不利环境条件,研究发现过表达 ABC 转运蛋白能够增加植物的表皮蜡,提升植物对非生物胁迫的耐受性^[53]。胡杨异形叶表皮结构的研究发现,与披针形叶相比,胡杨锯齿卵圆形叶的表皮蜡质沉积较多^[31]。本研究中,3 个 ABC 转运蛋白(XM_011033752.1、XM_011047107.1、XM_011047106.1)(表 3)受在锯齿卵圆形叶中下调的 miR1450 调控,能够参与胡杨异形叶表皮蜡跨膜转运,使锯齿卵圆形叶具有较多的表皮蜡质,进而具有较好的抗逆性。热休克蛋白是一种分子伴侣,能够参与植物的非生物胁迫响应。研究表明,胡杨热休克蛋白 HSP70 和 HSP90 在植株应对长期干旱胁迫过程中发挥重要作用^[54]。本研究发现,锯齿卵圆

形叶中下调的 miR1450 参与调控热休克蛋白(XM_011036267.1)(表 3)的表达, 能够使锯齿卵圆形叶对干旱胁迫具有较好的耐受性。NAC 转录因子广泛存在于陆生植物中, 主要参与植物的胁迫应答。早期研究发现, 胡杨 NAC 转录因子能够增强转基因植株的耐盐性^[55]。近期, 有研究通过过表达手段同时对 3 个胡杨 NAC 转录因子进行功能研究, 发现胡杨 NAC 转录因子提升了转基因植株的耐盐性和抗旱性^[56]。本研究中, NAC 转录因子(XM_011044984.1) 作为在锯齿卵圆形叶中下调的 miR3627 的靶基因(表 3), 能够参与调控胡杨异形叶的抗旱性及耐盐性, 使锯齿卵圆形叶对不利环境条件具有较好耐受性。以上研究结果表明, 胡杨通过 miRNA 的差异表达能够调控各类转录因子及关键基因, 影响异形叶的生长发育, 使锯齿卵圆形叶具有较好的耐盐性及抗旱性。

参 考 文 献

- [1] Nakayama H, Nakayama N, Nakamasu A, et al. Toward elucidating the mechanisms that regulate heterophylly[J]. *Plant Morphology*, 2012, 24(1): 57–63.
- [2] 叶元英, 柯卫东, 李峰, 等. 慈姑叶片结构的光学显微镜和扫描电镜观察[J]. *长江蔬菜*, 2013(18): 67–70.
Ye Y Y, Ke W D, Li F, et al. Observation of leaf structure of Chinese arrowhead (*Sagittaria trifolia* L.) by using optical microscope and scanning electron microscope[J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2013(18): 67–70.
- [3] Kordyum E, Klimenko E. Chloroplast ultrastructure and chlorophyll performance in the leaves of heterophyllous *Nuphar lutea* (L.) Smith. plants[J]. *Aquatic Botany*, 2013, 110: 84–91.
- [4] Leigh A, Zwieniecki M A, Rockwell F E, et al. Structural and hydraulic correlates of heterophylly in *Ginkgo biloba*[J]. *New Phytologist*, 2011, 189(2): 459–470.
- [5] Li G, Hu S, Yang J, et al. Water-wisteria as an ideal plant to study heterophylly in higher aquatic plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(8): 1225–1236.
- [6] 张金玲, 陈海鹏, 李玉灵, 等. 臭柏异形叶水分特性的比较[J]. *干旱区资源与环境*, 2018(5): 154–159.
Zhang J L, Chen H P, Li Y L, et al. Comparison of water characteristics in the heterophylly of *Sabina vulgaris*[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2018(5): 154–159.
- [7] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [8] Sunkar R. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019.
- [9] Mi C E. Characterization of five microRNA families in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(11): 2601–2612.
- [10] Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, et al. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss[J]. *Plant Journal*, 2005, 43(6): 837–848.
- [11] Rajewsky N, Succi N D. Computational identification of microRNA targets[J]. *Genome Biology*, 2004, 5(2): 5–39.
- [12] 王杏茹, 李文静, 陈冰星, 等. 蕹菜耐受长时间高温后的 miRNA 分析[J]. *园艺学报*, 2019, 46(3): 486–498.
Wang X R, Li W J, Chen B X, et al. Analysis of miRNA in water spinach (*Ipomoea aquatica*) under long-time high temperature[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(3): 486–498.
- [13] 彭廷, 文慧丽, 赵亚帆, 等. 盐、干旱胁迫下水稻相关 miRNA 的鉴定及表达分析[J]. *华北农学报*, 2018, 33(2): 20–27.
Peng T, Wen H L, Zhao Y F, et al. Identification and expressions analysis of rice miRNA related to salt and drought stresses[J]. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 2018, 33(2): 20–27.
- [14] 司婧娜, 周韬, 徐放, 等. 胡杨无性系幼苗响应盐胁迫的 miRNA 表达差异研究[J]. *植物研究*, 2015, 35(6): 836–842.
Si J N, Zhou T, Xu F, et al. Salt-responsive microRNAs in *Populus euphratica* by deep sequencing[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, 35(6): 836–842.
- [15] 郑彩霞, 邱箭, 姜春宁, 等. 胡杨多形叶气孔特征及光合特性的比较[J]. *林业科学*, 2006, 42(8): 19–24.
Zheng C X, Qiu J, Jiang C N, et al. Comparison of characteristics of stomas and photosynthesis of *Populus euphratica* polymorphic leaves[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2006, 42(8): 19–24.
- [16] 李萍萍, 曾明, 李文海, 等. 胡杨异形叶抗氧化能力的比较[J]. *北京林业大学学报*, 2019, 41(8): 76–83.
Li P P, Zeng M, Li W H, et al. Comparative study on antioxidant capacity of heteromorphic leaves of *Populus euphratica*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2019, 41(8): 76–83.
- [17] 韩航, 单凌飞, 王双蕾, 等. 胡杨异形叶光合作用特性研究[J]. *中央民族大学学报(自然科学版)*, 2019, 28(2): 5–11.
Han H, Shan L F, Wang S L, et al. Photosynthesis characteristics of heteromorphic leaves of *Populus euphratica*[J]. *Journal of MUC (Natural Sciences Edition)*, 2019, 28(2): 5–11.
- [18] Hao J, Yue N, Zheng C. Analysis of changes in anatomical characteristics and physiologic features of heteromorphic leaves in a desert tree, *Populus euphratica*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, 39(8): 160–170.
- [19] 岳宁, 郑彩霞, 白雪, 等. 胡杨异形叶的蛋白质组学研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(9): 40–44.
Yue N, Zheng C X, Bai X, et al. Proteomics analysis of heteromorphic leaves of *Populus euphratica* Oliv.[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(9): 40–44.
- [20] Bo X, Wang S. TargetFinder: a software for antisense oligonucleotide target site selection based on MAST and secondary structures of target mRNA[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(8): 1401–1402.
- [21] Wang H L, Lan L, Sha T, et al. Evaluation of appropriate reference genes for reverse transcription-quantitative PCR studies in different tissues of a desert poplar via comparison of different algorithms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 20468–20491.
- [22] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data

- using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2000, 25(4): 402–408.
- [23] Nakayama H, Nakayama N, Seiki S, et al. Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alteration in North American Lake Cress[J]. *The Plant Cell Online*, 2015, 26(12): 4733–4748.
- [24] Nakayama H, Sinha N R, Kimura S. How do plants and phytohormones accomplish heterophylly, leaf phenotypic plasticity, in response to environmental cues[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 10–17.
- [25] Zhang B, Pan X, Cobb G P, et al. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact[J]. *Developmental Biology*, 2006, 289(1): 3–16.
- [26] Zeng M, He S, Hao L, et al. Conjoint analysis of genome-wide lncRNA and mRNA expression of heteromorphic leaves in response to environmental heterogeneity in *Populus euphratica*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20: 5148–5871.
- [27] 白雪, 张淑静, 郑彩霞, 等. 胡杨多态叶光合和水分生理的比较[J]. *北京林业大学学报*, 2011, 33(6): 47–52.
- Bai X, Zhang S J, Zheng C X, et al. Comparative study on photosynthesis and water physiology of polymorphic leaves of *Populus euphratica*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2011, 33(6): 47–52.
- [28] 王海珍, 韩路, 徐雅丽, 等. 胡杨异形叶叶绿素荧光特性对高温的响应[J]. *生态学报*, 2011, 31(9): 2444–2453.
- Wang H Z, Han L, Xu Y L, et al. Response of chlorophyll fluorescence characteristics of *Populus euphratica* heteromorphic leaves to high temperature[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(9): 2444–2453.
- [29] Abel K, Anderson R A, Shears S B. Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism[J]. *Journal of Cell Science*, 2001, 114: 2207–2208.
- [30] Samuels L, Kunst L, Jetter R. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 683–707.
- [31] Liu Y, Li X, Chen G, et al. Epidermal micromorphology and mesophyll structure of *Populus euphratica* heteromorphic leaves at different development stages[J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10: e137701 (2015–10–09) [2018–05–21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137701>.
- [32] Mannuss A, Trapp O, Puchta H. Gene regulation in response to DNA damage[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2): 154–165.
- [33] Chen J, Zhang J, Hu J, et al. Integrated regulatory network reveals the early salt tolerance mechanism of *Populus euphratica*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6769–6781.
- [34] 曾幼玲, 杨瑞瑞. 植物 miRNA 的生物学特性及在环境胁迫中的作用[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(19): 3671–3682.
- Zeng Y L, Yang R R. Biological characteristics of plant microRNAs and actions in environmental stresses[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(19): 3671–3682.
- [35] 韦懿, 陈志辉, 陈国兴, 等. 超量表达水稻 miRNA 167A 调控株型的研究[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(4): 390–396.
- Wei Y, Chen Z H, Chen G X, et al. Study of overexpressing miRNA167a to regulate the architecture in *Oryza sativa*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(4): 390–396.
- [36] Merelo P, Ram H, Caggiano M P, et al. Regulation of MIR165/166 by class II and class III homeodomain leucine zipper proteins establishes leaf polarity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(42): 11973–11978.
- [37] 张文政, 韩颖颖, 严钦骅, 等. 拟南芥 miR172a-1/b-2/c 对多种胁迫响应的研究[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2011, 50(3): 328–333.
- Zhang W Z, Han Y Y, Yan Q H, et al. Research of arabidopsis miR172a-1/b-2/c in response to multiple stresses[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2011, 50(3): 328–333.
- [38] Li W, Wang T, Zhang Y, et al. Overexpression of soybean miR172c confers water deficit and salt tolerance but ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 67(1): 175–194.
- [39] 栾明达. 玉米 miR169 及其靶基因 NF-YA 转录因子功能的初步研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2014.
- Luan M D. Research of zma-miR169s and their targeted transcription factor ZmNF-YAs in maize [D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2014.
- [40] 叶超楠, 沈栎阳, 方春, 等. 热胁迫下水稻 miR396 家族及靶基因 OsGRFs 的表达研究[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(3): 393–400.
- Ye C N, Shen L Y, Fang C, et al. Expression analysis of rice (*Oryza sativa*) miR396 family and target gene OsGRFs under heat stress[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(3): 393–400.
- [41] Lian C, Li Q, Yao K, et al. *Populus trichocarpa* PtNF-YA9, a multifunctional transcription factor, regulates seed germination, abiotic stress, plant growth and development in *Arabidopsis* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1403 (2018–07–09)[2018–12–20]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01403>.
- [42] Yan D, Sha T, Xia X, et al. Identification of PeNF-YB1 expressed in leaves of *Populus euphratica* responsive to drought[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(19): 6–11.
- [43] Yi A, Yangyan Z, Xiao H, et al. The GATA transcription factor GNC plays an important role in photosynthesis and growth in poplar[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 71(6): 1969–1984.
- [44] 任逸秋, 贾会霞, 郭英华, 等. 胡杨 F-Box 基因克隆和功能分析[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(5): 1655–1662.
- Ren Y Q, Jia H X, Guo Y H, et al. Identification and functional analysis of F-Box gene from *Populus euphratica*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(5): 1655–1662.
- [45] Zhang L Y, Bai M Y, Wu J, et al. Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*[J].

- Plant Cell*, 2009, 21(12): 3767–3780.
- [46] Dong Y, Wang C, Han X, et al. A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in arabidopsis[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2014, 450(1): 453–458.
- [47] 钱泽勇, 张会龙, 荆晓妹, 等. 胡杨 Ring Finger E3 连接酶 PeRH2 提高烟草耐旱机制研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(3): 454–463.
- Qian Z Y, Zhang H L, Jing X S, et al. Overexpression of RING finger E3-ligase gene PeRH2 from *Populus euphratica* in tobacco enhances drought tolerance in transgenic plants[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(3): 454–463.
- [48] Fang H, Wang H L, Li H G, et al. PeCHYR1, a ubiquitin E3 ligase from *Populus euphratica*, enhances drought tolerance via ABA-induced stomatal closure by ROS production in *Populus*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(8): 1514–1528.
- [49] Silva P, Faanha A R, Rui M T, et al. Role of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ antiporter system in salt tolerance of *Populus euphratica* Oliv.[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29(1): 23–34.
- [50] Wang L, Feng X, Zhao H, et al. Functional analysis of the Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter PeNHX3 from the tree halophyte *Populus euphratica* in yeast by model-guided mutagenesis[J]. *Plos One*, 2014, 9(8): e104147(2015-02-03)[2018-04-22]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117869>.
- [51] Wu Y, Meng K, Liang X. Distinct patterns of natural selection in Na⁺/H⁺ antiporter genes in *Populus euphratica* and *Populus pruinosa*[J]. *Ecology & Evolution*, 2017, 7(1): 82–91.
- [52] Pighin J A, Huanquan Z, Balakshin L J, et al. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter[J]. *Science*, 2004, 306: 702–704.
- [53] Ningmei C, Buerbatu S, Shuai T, et al. Overexpression of the ABC transporter gene TsABCG11 increases cuticle lipids and abiotic stress tolerance in arabidopsis[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2018, 12(5): 303–313.
- [54] Yan D H, Fenning T, Tang S, et al. Genome-wide transcriptional response of *Populus euphratica* to long-term drought stress[J]. *Plant Science*, 2012, 195: 24–35.
- [55] Wang J Y, Wang J, He Y. A *Populus euphratica* NAC protein regulating Na⁺/K⁺ homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2013, 521(2): 265–273.
- [56] Lu X, Zhang X, Duan H, et al. Three stress-responsive NAC transcription factors from *Populus euphratica* differentially regulate salt and drought tolerance in transgenic plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 162(1): 73–97.

(责任编辑 赵勃
责任编辑 陈少良 陆海)