

# 松材线虫侵染下马尾松针叶 miRNA 和 mRNA 的关联表达

谢婉凤<sup>1</sup>, 梁光红<sup>2\*</sup>

(1. 福建农林大学金山学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** [目的] 微小 RNA (microRNA, miRNA) 具有靶向沉默信使 RNA (mRNA) 表达的功能, 是基因表达的负调控因子; 研究并明确马尾松在遭受松材线虫侵染下是否存类似的调控模式, 对于未来探析寄主植物对病原侵染胁迫下的应激机制及获得调控马尾松抗松材线虫病的 miRNA 及其靶标 mRNA 都具有重要意义。 [方法] 以前期高通量测序获得的松材线虫侵染 1、2、3 d 的马尾松针叶 mRNA 和 miRNA 表达谱为研究对象, 采用 STEM 软件分别分析 mRNA 和 miRNA 的表达变化模式, 并运用斯皮尔曼等级相关法研究松材线虫侵染下的马尾松针叶中 miRNA 与 mRNA 的表达关联情况。 [结果] 松材线虫侵染下的马尾松针叶中的 miRNA 呈 2 种显著的表达变化模式, mRNA 呈 8 种显著的表达变化模式, 且 15 个 miRNA 与其 12 个靶标 mRNA 的表达变化模式相反, 符合 miRNA 对靶标 mRNA 的负调控特点, 这些靶标 mRNA 编码具有识别病原作用的 *ACRE*、*CC-NBS-LRR* 基因等。 [结论] 松材线虫侵染下的马尾松针叶中 miRNA 及 mRNA 均呈多种表达变化模式, 且部分 miRNA 与靶标 mRNA 的表达变化模式相反, 推测其中部分 miRNA 可能是病原识别基因的负调控因子。

**关键词:** 马尾松; 松材线虫; 微小 RNA; 信使 RNA; 关联表达

中图分类号: S763.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)06-0007-08

## Expression Correlation Between miRNA and mRNA From Needle Leaves of *Pinus massoniana* with *Bursaphelenchus xylophilus* Infestation

XIE Wan-feng<sup>1</sup>, LIANG Guang-hong<sup>2</sup>

(1. Jinshan College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China;

2. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** [Objective] MicroRNA (miRNA) has the function of silence target mRNA expression, which is considered as a negative role in the regulation of gene expression. This study aims to reveal the potential expression correlation between miRNA and mRNA from needle leaves of *Pinus massoniana* with *Bursaphelenchus xylophilus* infestation, which helps to further indicate the mechanism of host plant in response to the pathogen infestation, and to obtain the particular miRNA and the target mRNA that involved in the regulation of masson pine resistance to pine wilt disease. [Method] Expression pools of miRNA and mRNA from *P. massoniana* with *B. xylophilus* infestation for 1, 2, and 3 d, which were generated using RNA-seq in our previous studies, were used as materials. The different expression profiles of miRNA or mRNA from *P. massoniana* with *B. xylophilus* infestation for different days were figured using STEM (Short Time-series Expression Miner) software, and method of Spearman Rank Correlation was employed to comparatively analyze the miRNA and mRNA expression profiles of *P. massoniana*. [Result] Two sig-

收稿日期: 2018-04-29 修回日期: 2018-09-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2017YFD0600105); 国家自然科学基金项目(31870641); 福建省教育厅中青年骨干教师教育科研基金(JAT170882)。

作者简介: 谢婉凤(1983—), 女, 博士, 讲师。研究方向: 林木病虫害生理与分子机制。E-mail: xwanzi@126.com

\* 通讯作者: 梁光红, 男(1975—), 博士, 副教授。研究方向: 林木有害生物综合治理。E-mail: fjlhg@126.com

nificant expression profiles were generated from the miRNA pools of *P. massoniana* with *B. xylophilus* infestation for 1, 2, and 3 d, whilst 8 significant profiles were generated from that of mRNA pools. Fifteen miRNAs were considered as candidates that obviously represented correlation with twelve mRNAs from the expression pools. The reverse expression profiles between the mRNA and miRNA validate the bio-function of transcriptional silence from miRNA to the target mRNA. The miRNA-targeted mRNA encodes ACRE, CC-NBS-LRR resistance-like gene, etc. These genes play roles in plant pathogen recognition. [ **Conclusion** ] It was clear that the infestation of *B. xylophilus* resulted in various expression profiles of miRNA and mRNA from the *P. massoniana*, and numbers of miRNA presented a reverse expression pattern in comparison with target mRNA. Among these miRNAs, several of them were speculated that function in silenced expression of genes involved with pathogen recognition.

**Keywords:** *Pinus massoniana*; *Bursaphelenchus xylophilus*; microRNA; mRNA; expression correlation

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 是我国南方重要荒山造林树种, 具有耐贫瘠, 速生丰产等优点, 被誉为“先锋树种”。松材线虫病被视为松树的“癌症”, 其具有危害大、隐蔽性强、致使寄主快速死亡并可人为远距离传播等特点, 致使防治该病害的工作存在较大困难, 松材线虫病疫点数量和发生面积逐年增大。有鉴于此, 明确马尾松抗松材线虫病的基因表达调控过程是当前利用现代生物学技术防控松材线虫病研究中不可缺少的部分。

非编码微小 RNA (microRNA, miRNA) 由于具有高效沉默靶向 mRNA 表达的特性, 成为当前生命科学中最受关注的对象之一<sup>[1-2]</sup>。这种长度为 20~24 nt 的单链非编码小 RNA 能够以 RNA 诱导沉默复合体的形式结合到靶基因上, 对靶基因进行降解或抑制靶基因的翻译, 从而在基因转录后对其进行表达沉默, 降低基因的表达丰度。这一新奇的基因表达调控方式自从 21 世纪初发现以来已受到国内外研究团队的密切关注<sup>[3-5]</sup>。

近年来的诸多研究均表明, miRNA 在调控植物生长发育和响应逆境胁迫的过程中起着十分重要的作用, 这包括调控植物抗旱、耐冷、抗病等多种行为<sup>[6-11]</sup>。在林木研究中, Wan 等<sup>[12]</sup> 利用本地 BLAST 和 MIREAP 程序从高山松 (*Pinus densata* Mast.) 的转录组数据中鉴定得到了 34 个保守的 miRNA, 其中, 25 个 miRNA 家族共有 72 个靶基因, 且大部分 miRNA 与 mRNA 具有靶向作用关系。Quinn 等<sup>[13]</sup> 在火炬松 (*Pinus taeda* L.) 的序列表达标签中发现 12 个未被报道的 miRNA, 这些 miRNA 作用的靶基因参与表达调控、代谢和信号转导。此外, Lu 等<sup>[14]</sup> 在对火炬松 miRNA 及其与松栎锈病病害发生的相关性研究中, 从火炬松茎干的木质部克隆并鉴定了 26 个 miRNA, 其中, 9 个家族 miRNA 能

够有效调控 43 个靶基因的表达。Xie 等<sup>[15]</sup> 测定了松材线虫侵染 1、2、3 d 及未受侵染的对照马尾松样本中 miRNA 表达谱, 结果显示, 侵染不同天数下的马尾松针叶中有 10 个 miRNA 均较对照样本发生差异表达, 其对应的靶基因在植物激素信号通路等途径富集。与此同时, 笔者前期也测定了松材线虫侵染 1、2、3 d 的马尾松针叶 mRNA 表达谱。本文在上述研究的基础上, 进一步研究松材线虫侵染下, 马尾松针叶的 mRNA 及 miRNA 表达关联情况, 通过比较二者的表达变化模式, 明确 miRNA 对重要 mRNA 的有效调控作用, 为揭示马尾松响应松材线虫侵染胁迫下的转录调控过程提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以前期通过 RNA-seq 测序获得松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 侵染 1、2、3 d 下的 2 年生马尾松及其对照样本针叶中 miRNA 和 mRNA 表达谱文库为研究对象<sup>[15]</sup>。处理及对照马尾松针叶 mRNA 和 miRNA 由广州基迪奥生物科技有限公司采用 Illumina HiSeq™2 500 进行测序, 其中, mRNA 测序采用 PE125 (paired end 125 bp) 策略, miRNA 测序采用 SE50 (single end 50 bp) 策略。

### 1.2 研究方法

1.2.1 松材线虫侵染下马尾松针叶的差异表达 mRNA 及 miRNA 的表达模式 使用 STEM (Short Time-series Expression Miner, <http://www.cs.cmu.edu/~jernst/stem>) 软件分别绘制松材线虫侵染 1、2、3 d 下的马尾松及其对照样本针叶的 miRNA 和 mRNA 不同表达变化模式图。

1.2.2 miRNA 与 mRNA 的表达关联分析 挑选具有靶向关系的差异表达 mRNA 和差异表达 miRNA,

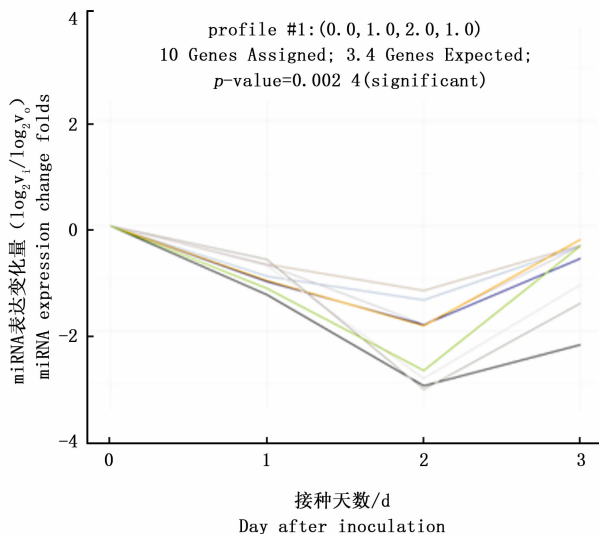
运用斯皮尔曼等级相关法计算这些 miRNA-mRNA 对在各自对应的两组模式中的相关性,得到相关系数。由于 miRNA 对其靶向 mRNA 具有负调控作用,因此,将斯皮尔曼等级相关系数小于等于  $-0.5$  的 miRNA-mRNA 对列出,得到目标 miRNA 及其靶向负调控的 mRNA。

1.2.3 表达量关联的 miRNA 及 mRNA 的热图 分别提取关联表达的 miRNA 与 mRNA 在松材线虫侵染 1、2、3 d 下的马尾松及其对照样本针叶中的表达量,采用广州基迪奥生物科技有限公司的 OmicShare 在线软件平台 (<http://www.omicshare.com/>),绘制松材线虫侵染 1、2、3 d 的马尾松较对照马尾松样本针叶中发生关联表达的 miRNA 与 mRNA 表达量热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫侵染下马尾松针叶的 miRNA 表达模式分析

基于前期 RNA-seq 得到的松材线虫侵染 1、2、3 d 的马尾松及其对照样本针叶的 miRNA 表达谱数



据,分析不同 miRNA 的表达变化模式,结果显示:侵染不同天数的马尾松针叶的 miRNA 表达量变化呈多种模式(profile),其中 profile 1 和 3 中的 miRNA 在侵染不同天数下的马尾松中较对照组表达变化差异显著,其 p 值均小于 0.05,且这些 miRNA 在侵染第 2 天的马尾松针叶中的表达较对照样本变化程度最大,说明松材线虫侵染 2 d 的马尾松针叶中基因表达响应强烈。通过对各组不同表达变化模式的 miRNA 数量进行统计,结果显示:profile 1 和 3 中分别有 10 个和 14 个 miRNA (图 1)。

### 2.2 松材线虫侵染下马尾松针叶的 mRNA 表达模式分析

进一步研究了 RNA-seq 得到的松材线虫侵染 1、2、3 d 的马尾松及其对照样本针叶的 mRNA 表达谱,对 mRNA 的表达变化模式进行分析,结果显示 mRNA 表达变化模式具有显著性的有 8 组,分别是 profile 2 (119 个基因),profile 4 (205 个基因),profile 6 (321 个基因),profile 7 (376 个基因),profile 11 (374 个基因),profile 14 (282 个基因),profile 22 (88 个基因) 和 profile 23 (123 个基因) (图 2)。

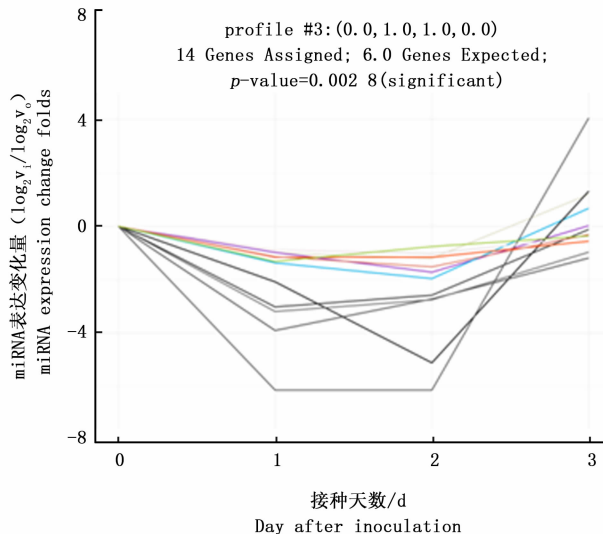


图 1 松材线虫侵染前后马尾松针叶 miRNA 表达变化显著的模式

Fig. 1 Significant miRNA expression profile of needle leaf of *P. massoniana* after different days of *B. xylophilus* infestation in comparison with the corresponding control

### 2.3 松材线虫侵染下,马尾松针叶中 miRNA 与 mRNA 的关联统计

为研究松材线虫侵染的马尾松针叶中可能由 miRNA 的降解作用而引起表达变化的 mRNA,进一步对表达变化模式相反的 miRNA 和 mRNA 进行关

联性分析。结果在 miRNA 表达变化模式中获得 15 个具有统计学关联性的 miRNA (表 1),与这些 miRNA 表达变化模式相反的靶标 mRNA 为 12 个,这些基因包括:(1)与病原识别相关的类 *CC-NBS-LRR* 抗性基因 (*CC-NBS-LRR resistance-like gene*)、*NBS*、

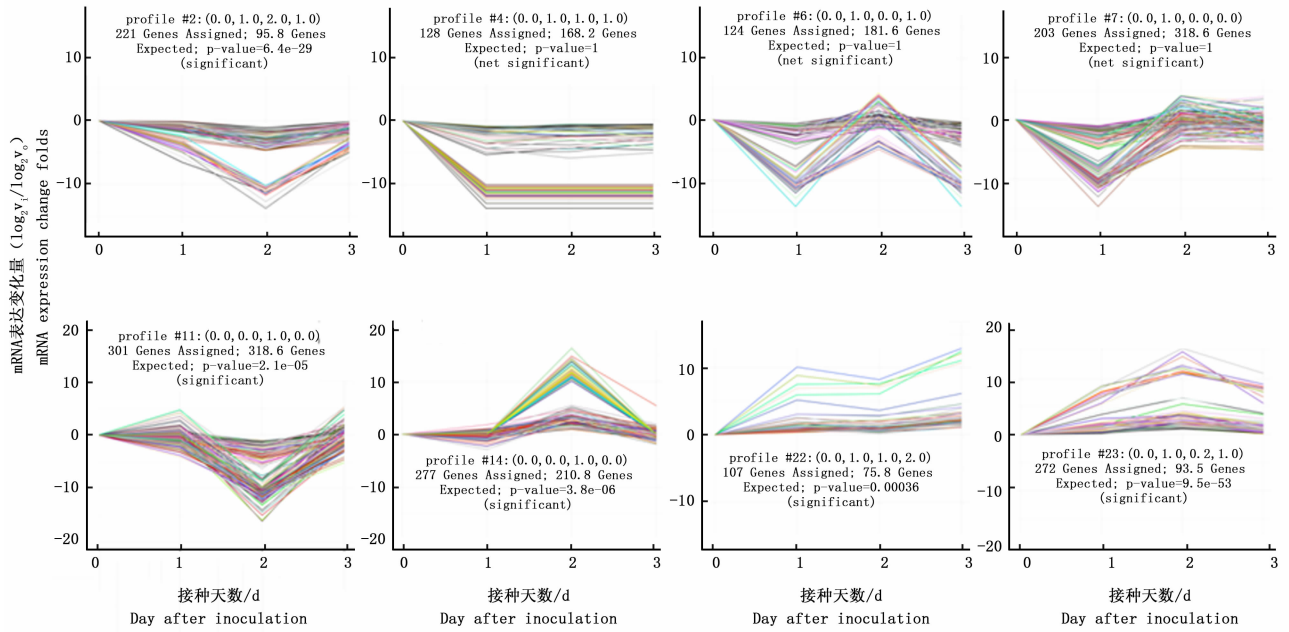


图2 松材线虫侵染下马尾松针叶 mRNA 表达变化显著的模式

Fig. 2 Significant mRNA expression profile of needle leaf of *P. massoniana* after different days of *B. xylophilus* infestation in comparison with the corresponding control

*TIR/NBS* 以及 *ACRE* (*Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene, *ACRE*); (2) 与转录调控相关的类 MYB 转录因子 *MBF1* (*MYB-like transcriptional factor, MBF1*); (3) 与防御相关的, 位于保守激酶 2 和 P-Loop 结构阈区间的抗性基因 (*resistance gene, region between conserved kinase-2 and P-Loop domains*)、棉子糖合成酶家族蛋白质异构体 1 (*Raffinose synthase family protein isoform 1*) 基因、类乙烯不敏感蛋白 3 异构体 1 (*ethylene insensitive 3-like isoform 1*) 基因; (4) 与植物生长发育相关的, 类 copia 反转录转座子 (*copia-like retrotransposable element*)、1, 2- $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶 (*1, 2-alpha-L-fucosidases*)、5'-腺苷酰硫酸还原酶 3 (*5'-adenylylsulfate reductase 3*)、反转录酶 (*reverse transcriptase*) 等的编码基因。在这些表达关联的 miRNA 与 mRNA 中, novel-m0040-3p 和 novel-m0040-5p 靶向作用的 *CC-NBS-LRR* 抗性基因, miR946、novel-m0136-3p、novel-m0051-3p 靶向作用的 *ACRE* 基因, 二者均是植物识别病原信号的直接基因。

深入分析表达关联的 miRNA 与 mRNA 的基因信息可见, 松材线虫侵染后, 马尾松针叶中的类 *CC-NBS-LRR* 基因、*ACRE* 基因受到其对应 miRNA 的沉默作用后, 其在受侵染的马尾松样本中的表达都较对照样本中的表达量低, 而相应的 miRNA 则在受侵

染样本中的表达量均高于对照样本, miRNA 与靶基因的表达变化模式相反体现了 miRNA 对靶 mRNA 的负调控作用。此外, 位于保守激酶 2 和 P-Loop 结构域之间的类似抗性基因与 miRNA5658 关联, 其中, miRNA5658 在处理样本中下调表达, 而其对应的靶基因即抗性基因则上调表达。逆转录酶基因在侵染 1、2 天的样本中上调表达并在第 3 天较对照样本表达下调, 其相应的 novel-m0019-3p 则在侵染第 1、2 天的处理样本中下调表达, 而在第 3 天表达上调。与光合作用相关的 5'-腺苷酰硫酸还原酶-3 的编码基因在处理的第 1 天表达上调, 在随后的第 2、3 天表达下调, 对应的 novel-m0157-3p 则是先下调表达后上调表达, 符合其对靶标 mRNA 的调控特征。此外, 编码棉子糖合成酶家族蛋白质异构体 1 的基因在侵染第 1 天的样本中的表达较对照样本下调, 侵染第 2 天的处理样本中的表达则高于对照样本, 侵染第 3 天的表达又低于对照样本, 其相应的 miRNA156 则在处理第 1 天的样本中表达量显著增加, 随后在侵染第 2、3 天时表达量降低 (图 3)。

### 3 讨论

就林木遗传育种而言, 由于传统技术存在周期长、成本高、遗传体系建立难度大等缺点, 致使优良林木品种的育种效率受到较大限制, 严重影响了优

表1 松材线虫侵染下马尾松针叶关联表达的 miRNA 和 mRNA  
 Table 1 The correlation between miRNA and mRNA expression pattern on needle leaf of *P. massoniana* after different days of *B. xylophilus* infestation comparison with the control group

miRNA	表达量(TPM)			预测靶标 mRNA			mRNA 表达量(RPKM)				
	CT	TR1	TR2	TR1	TR2	TR3	CT	TR1	TR2	TR3	
miR946	7 792.11	9 754.86	8 739.33	9 491.99	病原识别功能(pathogen recognition)			316.78	137.35	159.70	221.38
novel-m0136-3p	449.23	509.23	520.53	539.26	<i>R</i> gene, a homology of Av9/Cif-9 rapidly elicited defense-related gene ( <i>ACRE</i> ) ( <i>Pinus sylvestris</i> )			316.77	137.35	159.69	221.38
novel-m0051-3p	393.08	509.23	453.00	504.99	<i>R</i> gene, a homology of Av9/Cif-9 rapidly elicited defense-related gene ( <i>ACRE</i> ) ( <i>Pinus sylvestris</i> )			316.77	137.35	159.69	221.38
novel-m0040-5p	122.84	289.90	194.14	172.64	<i>R</i> gene, a homology of Av9/Cif-9 rapidly elicited defense-related gene ( <i>ACRE</i> ) ( <i>Pinus sylvestris</i> )			2.27	0	0	0
novel-m0040-3p	66.68	153.60	136.93	78.24	CC-NBS-LRR resistance-like gene( <i>Pinus lambertiana</i> )			2.27	0	0	0
miR472	5.62	0.69	0.94	5.17	CC-NBS-LRR resistance-like gene( <i>Pinus lambertiana</i> )			3.67	5.31	8.40	2.54
miR3705	6.32	0.69	5.63	2.59	NBS ( <i>Pinus taeda</i> )			0.53	1.33	0.50	3.68
miR858	197.94	100.32	60.03	200.44	TIR/NBS ( <i>Pinus taeda</i> )			0.94	3.33	1.85	1.14
miR156	1 000.25	2 315.04	1 365.58	1 379.83	转录调控功能(transcriptional regulation)			8.83	4.15	13.79	3.98
miR5658	4.91	1.38	1.88	0.01	MYB-like transcriptional factor MBFI ( <i>Picea mariana</i> )			0.24	1.55	0.46	2.96
novel-m0012-5p	4.83	0.01	0.01	0.01	防御功能(defense)			5.47	6.57	6.20	6.43
novel-m0172-3p	155.13	69.19	69.40	105.39	Raffinose synthase family protein isoform 1 ( <i>Theobroma cacao</i> )			1.04	2.12	1.09	1.78
novel-m0071-5p	80.72	36.67	28.13	65.31	resistance gene; region between conserved kinase-2 and P-Loop domains( <i>Pinus radiata</i> )			2.11	3.10	2.38	0.95
novel-m0157-3p	25.27	13.15	51.58	33.62	ethylene insensitive 3-like isoform 1 ( <i>Cucumis sativus</i> )			5.09	10.05	1.88	3.64
novel-m0019-3p	124.94	56.04	87.22	128.03	植物生长发育相关(plant growth and development)			1.42	2.80	1.84	0.25
					copia-like retrotransposable element ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )						
					1,2-alpha-L-fucosidases ( <i>Theobroma cacao</i> )						
					5'-adenylsulfate reductase 3, chloroplastic-like isoform 1 ( <i>Vitis vinifera</i> )						
					reverse transcriptase ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )						

注:CT;对照;TR1;侵染1天;TR2;侵染2天;TR3;侵染3天。

Note: CT; Control; TR1; 1 d after infestation; TR2; 2 d after infestation; TR3; 3 d after infestation.



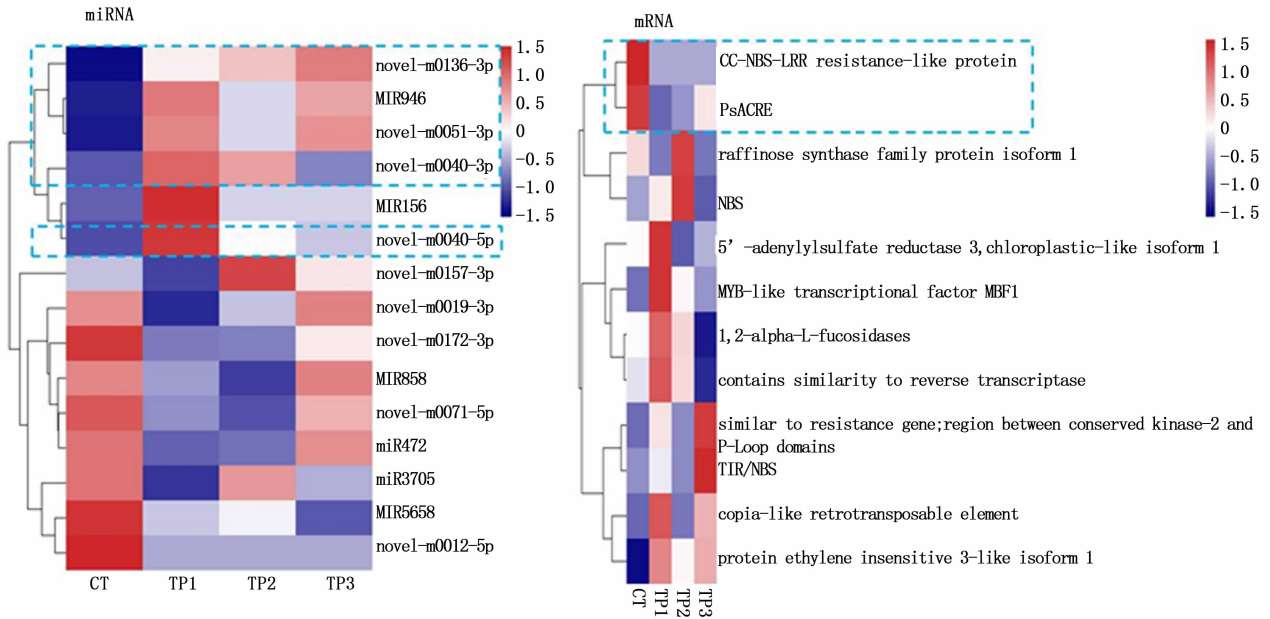


图3 松材线虫侵染下马尾松针叶中表达关联 miRNA 和 mRNA 的热图

Fig. 3 The heatmap of the correlative miRNA and mRNA from needle leaf of *P. massoniana* after different days of *B. xylophilus* infestation comparison with the control group

良品种的推广应用和林业产业的健康发展。近年来,随着现代分子生物学研究技术的不断发展及在其它作物育种领域的成功应用,未来利用分子遗传技术培育优良品种也将成为现代林木育种的新趋势与新方向<sup>[16]</sup>,其中,发掘林木抗逆防御的相关基因是实现其分子遗传育种的重要基础和努力方向<sup>[17-18]</sup>。通过比较同一种林木在环境条件变化下的转录组表达变化情况,能够明确供体样本的基因表达调控过程,并获得目标基因。笔者前期利用 RNA-seq 研究发现,松材线虫侵染抑制了马尾松针叶中 *R* 基因、类 *CC-NBS-LRR* 基因等与抗病能力密切相关的基因的表达,其中, *R* 基因与樟子松 (*Pinus sylvestris*) 的 *PsACRE* (a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene) 的相似度为 99%, 而 *PsACRE* 属于富含亮氨酸重复 (LRR) 家族的基因,其在接种担子菌的樟子松中表达增强<sup>[19]</sup>。课题组进一步克隆了马尾松 *ACRE* 基因的全长 CDS, 并成功遗传转化拟南芥<sup>[20]</sup>, 对转基因拟南芥及其未转基因的野生型植株接种松材线虫, 比较 2 种拟南芥的抗性能力, 结果显示: 转基因拟南芥对松材线虫的抵抗更强, 从而证实了 *ACRE* 基因对松材线虫抗病能力的调控作用, 也表明该基因可作为分子培育抗病马尾松的重要候选基因。深入揭示这些抗病密切相关基因的表达调控行为, 有利于阐明马尾松抗病能力

的内在机制。

转录组层面的基因表达变化包括 mRNA 和小 RNA 等的表达水平变化, 其中, 小 RNA 是一类短的调控 RNA, 其不具有编码基因的功能, 但其通过互补序列沉默基因, 在细胞的基因表达调控过程中具有重要的作用。这些小的寡核苷酸片段通过与沉默复合体 (RISC) 结合并作用于靶标 mRNA, 降解靶标 mRNA 而影响基因表达<sup>[21]</sup>, 其中, 由于 miRNA 在进化过程中十分保守, 且大部分植物的 miRNA 只在特定组织和特定阶段表达<sup>[22]</sup>, 因此, miRNA 是当前植物表观遗传学研究的一个热门方向。本文结合前期研究结果发现, 松材线虫侵染的马尾松针叶中 miRNA 的表达丰度随着侵染时间延长也在发生改变, 其中大部分 miRNA 在侵染第 2 天的马尾松针叶中表达变化最强烈<sup>[15]</sup>, 这预示该时期下的马尾松针叶中的 mRNA 表达将受到 miRNA 的有力调控, 并可从中发掘调控马尾松抗松材线虫病害能力的相关 miRNA 和 mRNA, 为抗病马尾松的分子育种提供基因资源。

对 miRNA 和 mRNA 的表达关联分析显示, 马尾松针叶中类 *CC-NBS-LRR* 抗性基因、属于 *LRR* 家族的 *ACRE* 基因等的表达分别受到了 miR946, novel-mi0136-3p 和 novel-mi0051-3p, 以及 novel-mi0040-5p 和 novel-mi0040-3p 的调控。 *CC-NBS-LRR* 类抗病相

关基因是调节植物抗病免疫反应的一类重要基因, NBS (nucleotide binding site) 存在于真核生物的许多蛋白中,主要负责 ATP 的水解以及释放信号,其 N 端包含一个 TIR (Toll and interleukin-1 receptor) 结构<sup>[23]</sup>。CC-NBS 的增强表达可以激活植物的抗病防御能力;与之相似的还有一个编码类似抗性基因的片段(similar to resistance gene; region between conserved kinase-2 and P-Loop domains),该片段介于保守激酶 2 (conserved kinase-2) 和 P-Loop 结构域(P-Loop domains)之间,可能受到 *miR5658* 的调控。由此可见,马尾松中抗病密切相关的 CC-NBS-LRR, LRR 等基因的表达均受到了相应的 miRNA 的调控。在此基础上,通过外源调控技术抑制负调控作用的 miRNA 表达,以及转基因技术提高抗病基因在马尾松中的表达均有望获得抗病能力提高的马尾松株系,促进抗病马尾松的培养。

miRNA 还调控转录因子的表达,如 *miR585* 调控的 MYB-like transcriptional factor *MBF1*,这是一类含有 MYB 结构域的转录因子,这种结构域具有一段约 51 ~ 52 个氨基酸的肽段,包含一系列高度保守的氨基酸残基和间隔序列,参与植物苯丙烷类次生代谢途径的调节<sup>[24]</sup>,苯丙烷类代谢是植物主要的 3 条次生代谢途径之一,它起始于苯丙氨酸,经过几个共同步骤后,分成 2 个主要分支途径,其中一条分支称为黄酮类代谢途径,这些次生物质参与植物的防御反应,属于植保素类物质。可见松材线虫侵染马尾松可能影响了其植保素类物质合成的上游调控基因,进而改变这些物质的合成能力。除此之外,马尾松针叶中与叶绿体内硫酸盐吸收与还原相关的 5'-腺苷酰硫酸还原酶,与遗传信息传递相关的反转录酶基因,与植物生长发育及防御相关的 1, 2- $\alpha$ -L 岩藻糖苷酶(1, 2- $\alpha$ -L-fucosidases)、棉子糖合成酶等基因的表达也受到了相应 miRNA 的调控,这些基因分别参与植物体生长发育、遗传信息传递以及抗逆境胁迫的过程<sup>[25-27]</sup>,其表达丰度的变化将最终影响马尾松针叶细胞的代谢能力。上述基因及调控其表达的 miRNA 的发掘也为马尾松的分子育种提供了基因基础。

## 4 结论

本文通过对松材线虫侵染下,马尾松针叶 miRNA 和 mRNA 的表达变化模式及其关联情况进行研究,结果推测 miRNA 负调控了松材线虫侵染下的马

尾松针叶中相关防御、代谢及转录调控基因的表达,且 CC-NBS-LRR、ACRE 等抗病密切相关基因的表达也可能受到相应 miRNA 的负调控。进一步采用 miRNA 和靶标 mRNA 的共表达能够验证 miRNA 对靶标 miRNA 表达的有效负调控作用。马尾松响应松材线虫侵染的抗性基因及调控其表达的小 RNA 的发掘可为抗病马尾松的分子设计与遗传育种提供重要的理论基础与基因资源,并为松类树木的抗病机制研究提供借鉴,以此加快抗病松树的现代分子育种进程。

## 参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [2] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs [J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(2): 93-103.
- [3] Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294(5543): 862-864.
- [4] 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.
- [5] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [6] Zhang B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(7): 1749-1761.
- [7] Ferdous J, Sanchez-Ferrero J C, Langridge P, et al. Differential expression of microRNAs and potential targets under drought stress in barley [J]. Plant, Cell & Environment, 2017, 40(1): 11-24.
- [8] Lima J C D, Loss-Morais G, Margis R. MicroRNAs play critical roles during plant development and in response to abiotic stresses [J]. Genetics and Molecular Biology, 2012, 35(4): 1069-1077.
- [9] Chen Q, Li M, Zhang Z, et al. Integrated mRNA and microRNA analysis identifies genes and small miRNA molecules associated with transcriptional and post-transcriptional-level responses to both drought stress and re-watering treatment in tobacco [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 62.
- [10] Yang L, Huang H. Roles of small RNAs in plant disease resistance [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(10): 962-970.
- [11] 李丹蕾, 张瑞芝, 王峰, 等. MicroRNA 转录后调控欧美杨 *R2R3-MYBs* 抗锈菌表达 [J]. 林业科学研究, 2017, 30(2): 254-259.
- [12] Wan L C, Zhang H, Lu S, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of miRNAs from *Pinus densata* [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 132.
- [13] Quinn C R, Iriyama R, Fernando D D. Computational predictions

- and expression patterns of conserved microRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2015, 11(1): 1 – 11.
- [14] Lu S, Sun Y H, Amerson H, *et al.* MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(6): 1077 – 1098.
- [15] Xie W, Huang A, Li H, *et al.* Identification and comparative analysis of microRNAs in *Pinus massoniana* infected by *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 83(2): 223 – 232.
- [16] Holliday J A, Aitken S N, Cooke J E K, *et al.* Advances in ecological genomics in forest trees and applications to genetic resources conservation and breeding [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(3): 706 – 717.
- [17] 武苾菲, 李万峰, 徐海燕, 等. 中间锦鸡儿 *CiDRI* 的克隆及干旱胁迫下的表达分析 [J]. *林业科学研究*, 2017, 30(2): 238 – 244.
- [18] 王江英, 范正琪, 殷恒福, 等. 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因的克隆、表达及功能分析 [J]. *林业科学研究*, 2016, 29(4): 471 – 479.
- [19] Li G S, Asiegbu F O. Induction of *Pinus sylvestris* *PsACRE*, a homology of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited defense-related gene following infection with root rot fungus *Heterobasidion annosum* [J]. *Plant Science*, 2004, 167(3): 535 – 540.
- [20] 李慧敏, 谢婉凤, 冯丽贞, 等. *PmACRE* 基因的克隆及遗传转化拟南芥 [J]. *森林与环境学报* 2018, 38(1): 13 – 19.
- [21] Valenciasanchez M A, Liu J, Hannon G J, *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs [J]. *Genes & Development*, 2006, 20(5): 515 – 524.
- [22] Willmann M R, Poethig R S. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(5): 503 – 511.
- [23] Mehale L, Tan X, Koehl P, *et al.* Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards [J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): 212.
- [24] Martin C, Paz ares J. MYB transcription factors in plants [J]. *Trends in Genetics*, 1997, 13(2): 67 – 73.
- [25] Rotte C, Leustek T. Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(2): 715 – 724.
- [26] Martin M N, Tarczynski M C, Shen B O, *et al.* The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants [J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 86(3): 309 – 323.
- [27] Augur C, Stiefel V, Darvill A, *et al.* Molecular cloning and pattern of expression of an  $\alpha$ -*l*-fucosidase gene from pea seedlings [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(42): 24839 – 24843.

(责任编辑:张 研)