

## mRNAs/microRNAs 调控网络探索石斛花型差异分子机理研究

臧睿, 陈宇, 赵美, 郝玉恒, 敖叠, 李凯莉, 方诗迪, 赵奇明, 和凤美\*

云南农业大学园林园艺学院, 云南昆明 650201

**摘要:** 目前兰科植物花型多样性形成分子机理仍不清楚, 本研究对铁皮石斛、美花石斛花器官进行转录组和 microRNA 测序, 通过 cytoscape 构建 miRNA-mRNA 网络和靶基因蛋白互作网络并进行差异比较, 以期在分子水平上探究 2 种石斛花型差异分子机理。转录组研究结果表明, 与花发育相关的 mRNAs 有 MADS-box *AP3* 基因、激素类基因等。miRNA-mRNA 网络分析表明, 差异表达的 miRNAs、mRNAs 参与了花型差异形成, miR5179 与靶基因 *AP3*、miR160 与靶基因 *ARFs*、miR164 与靶基因 *NAC021*、miR159 与靶基因 *GAMI*、bdi-miR159 与靶基因 *CKX9*、miR167b-3p 与靶基因 *ANT* 可能参与花型形成, 以上 miRNA 均在铁皮石斛中上调表达。蛋白互作通路表明, 2 种石斛有 *AP3* 这一关键基因, 美花石斛缺少 *CUL1*、*TIR1*、*TIRIA*、*RBS* 四个基因; 2 种石斛的生长素反应互作通路中存在 2 个差异表达的 *ARFs* 基因, 美花石斛缺失 1 个 *ARFI* 基因; 美花石斛特异性地拥有由 *NAC021* 基因构成的生长素信号转导靶基因蛋白互作通路。铁皮石斛和美花石斛花型差异表达 miRNAs/mRNAs 以及靶基因蛋白互作差异可能是导致 2 种石斛花型差异的主要机理。

**关键词:** 铁皮石斛; 美花石斛; 花型; 转录组; small RNA; 调控网络

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

## Differential Molecular Mechanism of *Dendrobium* Flower Pattern Using mRNAs/microRNAs Regulatory Network

ZANG Rui, CHEN Yu, ZHAO Mei, HAO Yuheng, AO Die, LI Kaili, FANG Shidi, ZHAO Qiming, HE Fengmei\*

College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

**Abstract:** The molecular mechanism of the formation of flower diversity is still unclear. In this study, the transcriptome and microRNA sequencing of *Dendrobium officinale* and *D. loddigesii* flower organs were performed, and the miRNA-mRNA network and target protein interaction network were constructed by cytoscape and compared at the molecular level. The results of transcriptome studies showed that mRNAs related to flower development had MADS-box *AP3* gene, hormone genes, etc. The miRNA-mRNA network analysis showed that the differentially expressed miRNAs and mRNAs were involved in the differential formation of floral pattern, and miR5179 and its target genes *AP3*, miR160 and their target genes *ARFs*, miR164 and its target genes *NAC021*, miR159 and the target genes *GAMI*, bdi-miR159 and the target genes *CKX9*, miR167b-3p and the target genes *ANT* may be involved in floral pattern formation, and the above miRNA was upregulated in *D. officinale*. The protein interaction pathway showed that two kinds of dendrobium had the key gene of *AP3*, *D. loddigesii* lacked four genes: *CUL1*, *TIR1*, *TIRIA* and *RBS*; there were two differentially expressed *ARFs* genes in the auxin response interaction pathway of two *Dendrobium*, and *D. loddigesii* lacked one *ARFI* gene; *D. loddigesii* flora specifically possessed the protein interaction pathway of auxin signal transduction target genes constituted by the *NAC021* gene. Differential expression of miRNAs/mRNAs in *D. officinale* and *D. loddigesii* and protein interaction of target genes may be the main mechanisms leading to the difference between the two *Dendrobium* flower types.

收稿日期 2023-02-02; 修回日期 2023-02-17

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32260419); 研究生创新课题 (No. 2022ZKY463)。

作者简介 臧睿 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子植物育种。\*通信作者 (Corresponding author): 和凤美 (HE Fengmei), E-mail: hefengmei918@126.com。

**Keywords:** *Dendrobium officinale*; *Dendrobium loddigesii*; flower pattern; transcriptome; small RNA; regulatory network

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.005

MicroRNAs (miRNAs) 是由单链前体 (pre-miRNAs) 自发配对形成发夹状结构,并在转录后通过介导靶基因 RNA 的降解或抑制蛋白质的翻译调控基因表达的非编码小 RNA (small RNAs, sRNAs)。在植物叶和根的形态发生、花的诱导、器官发生、繁殖和胁迫响应等逆向生物学过程中发挥重要作用<sup>[1-3]</sup>。根据前人研究意大利兰的花序中一个 MADS-box/*DEF-like* (*AP3*) 转录本被 miR5179 同源物所切割<sup>[4]</sup>,在水稻中存在 miR5179 靶向调控 MADS-box 类基因<sup>[5]</sup>。*AP3* 基因有调控多元化花被片和唇瓣的功能,表明在进化过程中存在 miRNA 介导的花发育调控机制。此外 miRNA172 作为 *AP2* 的负调控因子可抑制 *AP2* 基因表达,花期提前,使花瓣数目减少<sup>[6-7]</sup>。苹果、拟南芥中均有 miR160-Auxin 响应因子 (*ARF*)<sup>[8-9]</sup>。miR164 家族 (miR164a, miR164b, miR164c) 与其靶基因 *NAC* (*CUC1* 与 *CUC2*) 间的关系决定了植物花型的完整性<sup>[10]</sup>。在春兰中, miR319/*TCP4*-miR396/*GRF* 联级调控多膜细胞增殖发育<sup>[11]</sup>。

目前对花模式和花型发育的分子机制的了解还很有限,兰科植物花器官高度特化,形态多样,为花的形态调控分子机理的研究提供了素材模式<sup>[12-13]</sup>。铁皮石斛 (*D. officinale*) 和美花石斛 (*D. loddigesii*) 花器官迥异,唇瓣形态差异巨大,铁皮石斛唇瓣为反折的卵状披针形,美花石斛的唇瓣边缘具短流苏呈筒状向内翻卷的近圆形<sup>[14]</sup>,是研究花器官形态差异分子机理的理想材料。本研究通过高通量测序技术检测 2 种石斛的差异显著的花器官,对 microRNA 和 mRNA 表达谱进行分析,构建 miRNA-mRNA 调控网络,以期识别对 2 种花型形成起到调控作用的差异 miRNAs 及调控的靶点,以及靶基因互作差异,以期了解石斛属植物负责调控花被表型及调控花形态发生的分子调控机制,并为未来兰花分子植物育种提供一定科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所采用的铁皮石斛、美花石斛组织培养苗种植于云南农业大学园林园艺学院基地大

棚,开花时期采摘其花蕾放入液氮冻存。

### 1.2 方法

1.2.1 转录组及 micro RNA 文库的构建与测序 采用 Trizol 试剂分别提取铁皮石斛和美花石斛不同大小花蕾总 RNA, cDNA 文库和小 RNAs 文库构建和测序方法参考文献<sup>[15-19]</sup>,测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2.2 转录组功能注释 使用 Diamond 软件在 NR、Swiss-Prot、COG 数据库进行序列比对,使用 Blast2g、HMMER 软件分别在 GO、Pfam 数据库比对,使用 KOBAS2.1 软件获得 KEGG Orthology 结果。

1.2.3 miRNAs 鉴定 在 Illumina 测序平台进行 small RNA 测序。测序得到的原始数据经过滤后得到有效序列,有效序列经比对和软件预测分别得到铁皮石斛和美花石斛文库,以及保守 miRNAs 和新 miRNAs,具体方法参考文献<sup>[20-21]</sup>。

1.2.4 DEGs 分析 利用 RSEM 分析表达水平,定量指标为 TPM (transcripts per million reads)。基于表达量定量结果,使用 DEGseq 进行组间差异基因分析,对不同样品间的 raw counts 进行标准化处理,  $|\log_2FC| \geq 1$  &  $padjust < 0.001$  作为过滤条件,筛选差异表达的 miRNAs 和 mRNAs,采用 BH (fdr correction with Benjamini/Hochberg) 对 *P*-value 进行矫正。

1.2.5 miRNA- mRNA 调控网络的构建 使用 psRobot 预测 miRNAs 的靶基因,对 miRNA 与 mRNA 的表达量进行关联分析,获得表达相关性 (正调控或负调控),使用 Cytoscape 软件可视化。设置 TSS 上游 5000 到下游 1000, *P*-value 阈值 (FIMO) 为 0.000 05。

1.2.6 蛋白互作网络构建 使用 STRING 数据库进行蛋白互作网络分析,获得蛋白互作关系 (protein-protein interaction, PPI),将所得结果导入 Cytoscape 软件中进行可视化处理,构建 PPI 网络。

## 2 结果与分析

### 2.1 铁皮石斛、美花石斛的花器官形态学特征比较分析

铁皮石斛与美花石斛花型有很高观赏价值,其中唇瓣是主要观赏部位,表形差别最大。铁皮

石斛具长圆披针形萼片和花瓣, 萼片长约 1.8 cm, 宽 4~5 mm, 具 5 条脉; 唇瓣基部具 1 个绿色或黄色的胼胝体, 卵状披针形, 中部反折 (图 1A)。美花石斛花瓣与萼片近似呈卵状披针形, 宽 8~9 mm; 唇瓣近圆形, 直径 1.7~2.0 cm, 上面中央金黄色, 呈筒状向内翻卷, 边缘具短流苏, 两面密布短柔毛 (图 1B)。

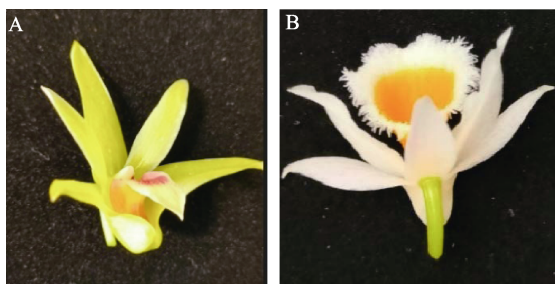


图 1 铁皮石斛 (A) 和美花石斛 (B) 完全开放的花器官

Fig. 1 Fully open floral organs of *D. officinale* (A) and *D. oddigesii* (B)

## 2.2 转录组测序组装及分析

本研究检测到 2 种石斛的表达基因共 26 789 个。铁皮石斛 25 821 个, 其中已知基因 21 169 个, 新基因 4652 个; 美花石斛 21 586 个, 其中已知基因 19 546 个, 新基因 2040 个。共有 22 724 (88.01%)、21 058 (97.55%) 个序列得到注释。

## 2.3 花发育、激素反应相关基因分析

铁皮石斛中获得 92 个与花发育相关的基因, 根据功能注释和序列比对, 其中 AP2 类基因 6 个, MADS-box 家族基因 63 个, NAC 类基因 4 个, MYB 类基因 3 个, TCP 家族基因 16 个 (图 2)。美花石斛中获得 69 个与花发育相关的基因, 其中 AP2 类基因 6 个, MADS-box 家族基因 42 个, NAC 类基因 5 个, MYB 类基因 2 个, TCP 家族基因 14 个 (图 3)。与激素反应 (Auxin、GA、CTK、ABA、BR) 有关的基因, 铁皮石斛中有 206 个, 美花石斛中有 193 个。

## 2.4 miRNA 分析及靶基因预测

sRNA 统计中铁皮石斛、美花石斛的 miRNA 序列分别有 226 904、79 225 个。而 miRNA 成熟体分别为 2755、2230 个, 其中 2600、2185 个为已知 miRNAs, 155、45 个为未知 miRNAs。铁皮石斛、美花石斛中表达量最高的是 miR319 家族, 此外, miR535、miR159 和 miR171 家族等也有高丰度的表达。

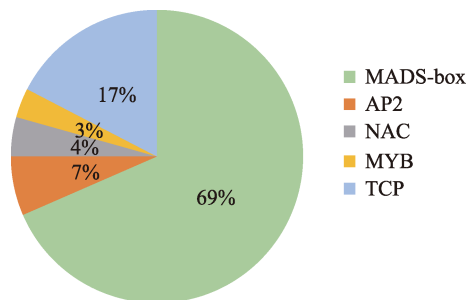


图 2 铁皮石斛与花型发育有关基因统计  
Fig. 2 Statistics of genes involved to floral development in *D. officinale*

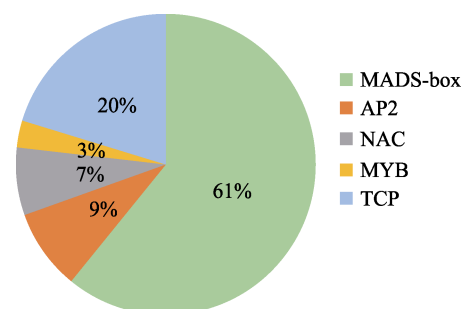


图 3 美花石斛与花型发育有关基因统计  
Fig. 3 Statistics of genes involved to floral development in *D. loddigesii*

铁皮石斛有 2496 个 miRNA 预测到了 1264 个靶基因, 6 个未知 miRNAs; 美花石斛有 2076 个 miRNA 预测到了 1609 个靶基因, 2 个未知 miRNAs, 根据其靶向关系, 存在一个基因被多个 miRNA 靶向, 一个 miRNA 靶向多个基因。这些 miRNA 的靶基因大多被归类为转录因子, 如 MADS-box 转录因子 (miR5179)、MYB 家族转录因子 (miR159、miR319) 等。其他一些基因被归类为功能性基因蛋白质, 如 F-box 蛋白 (miR393、miR394)、cytokinin dehydrogenase 4-like (miR159) 等, 均参与植物的代谢和环境刺激反应。Novel miRNA 的靶基因大多归类为未知功能基因。

## 2.5 与花型发育有关的 miRNA 及其靶基因

本项目拥有 2 个共表达的 miR5179 家族成员 *osa-miR5179* 和 *bdi-miR5179*, 成熟序列相同 (UUUUGCUC AAGACCGCGCAAC), 长度为 21 bp, 且定位到参考基因组上, 靶向 2 个差异表达的 AP3 基因, 根据序列比对 *MADS16* (LOC110093040) 为 AP3-3 基因, *MADS16* (LOC110103364) 为 AP3-2 基因, 它们可能是 2 种石斛花型形成的关键差异 miRNA 及靶基因。miR319、miR159 共同调控 2 个参与花器官发育

且为赤霉素转录激活因子 (*GAMI*) 的 MYB 类基因, *ath-miR5021* 调控与花型发育有关的 4 个 TCP 家族基因; 3 个 *APETALA2-like* 的基因与 *miR172* 相互作用, *miR164* 调控 2 个与花型发育相关的 NAC 家族基因; 此外 *miR167* 与 2 个作为生长素转录因子的基因 (*ARF*) 相互作用, *bdi-miR159c* 调控 1 个催化细胞分裂素的氧化基因 (*CKX9*), *miR160* 靶向 4 个作为生长素转录因子的基因 (*ARF*), *miR167* 靶向 *ANT*。另外, *miR408*, *miR528* 也调控生长素转录因子的表达。这与前人的研究

结果一致, 因此, 推测以上 miRNA 及其靶基因为花型形成候选 miRNA 和靶基因。

## 2.6 miRNA-mRNA 调控网络构建

将表达 miRNA 及其靶标进行 miRNA-mRNA 关联分析, 最后将数据导入 Cytoscape 软件对 miRNA-mRNA 调控网络进行可视化处理, 筛选与花型形成有关 miRNA 及其靶基因, 得到 22 个共表达的靶基因及其相关 miRNA, 和在铁皮石斛中特异性表达的 *vca-miR167b-3p* 及其靶基因 (表 1)。

表 1 miRNA-mRNA 调控网络中与花型发育有关的 miRNA 及其靶基因统计

Tab. 1 Statistical of the miRNA and its target genes involved in floral pattern development in miRNA-mRNA regulatory network

基因名称 Gene name	TP_1vsMH_2 (log <sub>2</sub> FC)	miRNA	TP_1vsMH_2 (log <sub>2</sub> FC)	Nr 注释 Nr description
<i>MADS16</i> (LOC110106631)	-0.768 830 261 30	<i>osa-miR5179</i> ; <i>bdi-miR5179</i>	-1.622 324 615 93	MADS-box transcription factor 16-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>MADS16</i> (LOC110093040)	1.109 557 191 60	<i>osa-miR5179</i> ; <i>bdi-miR5179</i>	-1.622 324 615 93	MADS-box transcription factor 16 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>MADS16</i> (LOC110103364)	-2.072 810 395 28	<i>osa-miR5179</i> ; <i>bdi-miR5179</i>	-1.622 324 615 93	MADS-box transcription factor 16 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>MADS16</i> (LOC110096227)	0.553 360 403 33	<i>bdi-miR5179</i> ; <i>osa-miR5179</i>	-1.622 324 615 93	MADS-box transcription factor 16 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AP2-3</i> (LOC110107829)	-0.786 369 378 60	<i>miR172</i>	-0.058 359 940 00	APETALA2-like protein 3 isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AP2</i> (LOC110095317)	0.682 606 379 14	<i>miR172</i>	-0.058 359 940 00	AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3 isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AP2</i> (LOC110097153)	-1.824 070 389 73	<i>miR172</i>	-0.058 359 940 00	AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>NAC021</i> (LOC110116607)	2.926 867 836 60	<i>miR164</i>	-1.424 862 521 69	NAC domain-containing protein 21/22-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>NAC021</i> (LOC110104882)	3.566 692 272 30	<i>miR164</i>	-1.424 862 521 69	NAC domain-containing protein 21/22 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>GAMI</i> (LOC110091872)	4.058 220 420 70	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	transcription factor GAMYB isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>GAMI</i> (LOC110114505)	1.515 427 374 20	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	transcription factor GAMYB isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>TCP2</i> (LOC110093292)	0.623 023 112 54	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	transcription factor TCP2 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>TCP24</i> (LOC110114709)	-0.043 670 325 15	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	transcription factor TCP24-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>TCP2</i> (LOC110094248)	-0.570 975 362 11	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	transcription factor TCP24-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>TCP3</i> (LOC110094779)	-0.192 780 588 84	<i>miR319/159</i>	0.551 705 000 00/ -1.113 824 573 00	Transcription factor TCP3 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>ANT</i> (LOC110101314)	-1.132 614 587 44	<i>vca-miR167b-3p</i>	-3.000 836 239 18	AP2-like ethylene-responsive transcription factor ANT [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>CKX9</i> (LOC110102256)	-2.019 303 535 24	<i>bdi-miR159c</i>	-1.766 370 985 55	cytokinin dehydrogenase 4-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>ARF12</i> (LOC110112646)	-0.111 328 536 76	<i>miR167</i>	-0.522 373 360 00	auxin response factor 12 isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>ARF17</i> (LOC110104921)	0.474 397 750 04	<i>miR167</i>	-0.522 373 360 00	auxin response factor 17-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>ARF18</i> (LOC110109117)	4.009 699 676 01	<i>miR160</i>	0.745 670 000 00	auxin response factor 18 isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AFR18</i> (LOC110102977)	1.303 956 073 39	<i>miR160</i>	0.745 670 000 00	auxin response factor 18 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AFR17</i> (LOC110112371)	2.057 551 206 44	<i>miR160</i>	0.745 670 000 00	auxin response factor 17 isoform X1 [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]
<i>AFR18</i> (LOC110091857)	-0.093 840 471 84	<i>miR160</i>	0.745 670 000 00	LOW QUALITY PROTEIN: auxin response factor 18-like [ <i>Dendrobium catenatum</i> ]



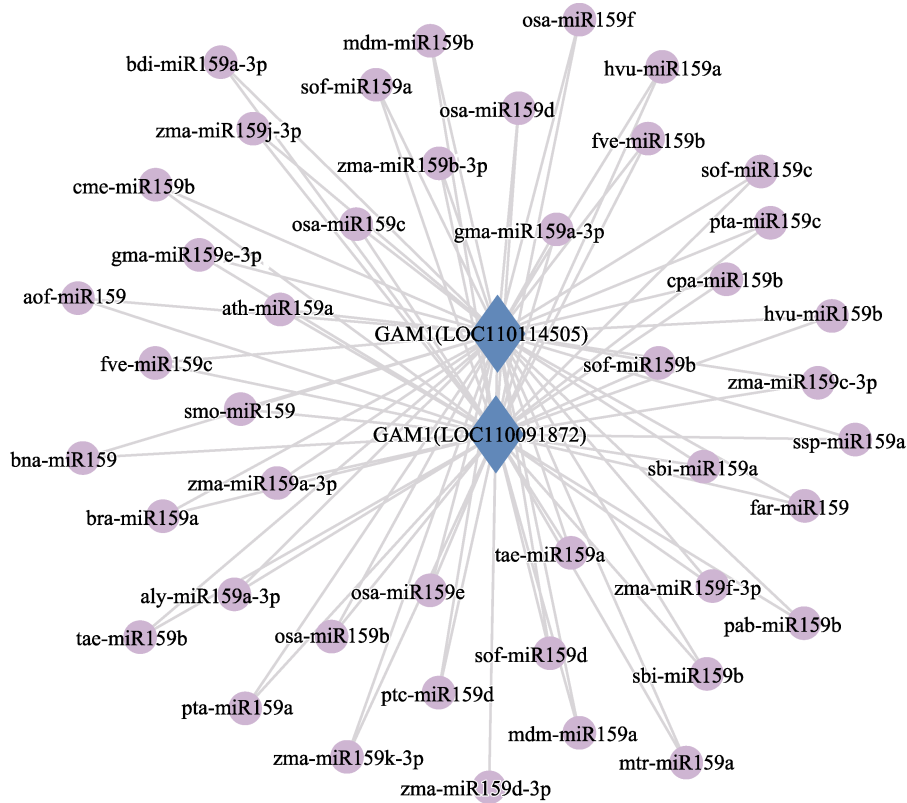
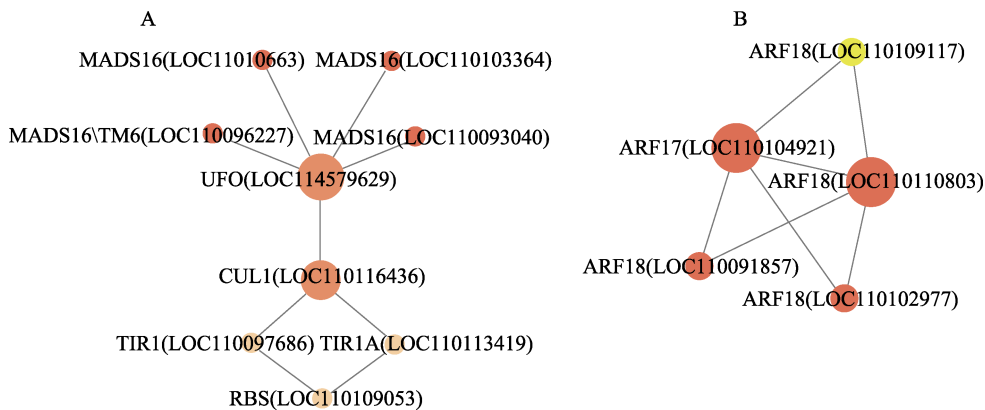


图 6 miR159 调控网络  
Fig. 6 miR159 regulatory network

2.7 靶基因 PPI 网络

借助 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对 2 种石斛构建 PPI 网络，在可视化网络筛选关联分析得到的靶基因。铁皮石斛与美花石斛花发育相关的蛋白互作通路和生长素反应互作通路各不相同。铁皮石斛花发育互作通路中 *AP3-2* (LOC110103364) 基因表达量远高于美花石斛，

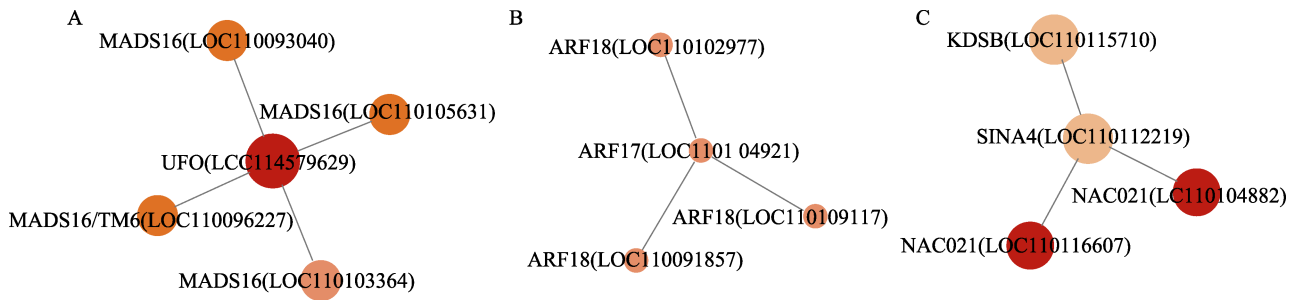
*AP3-3* (LOC110093040) 基因表达量远低于美花石斛，美花石斛缺少 *CUL1*、*TIR1*、*TIR1A*、*RBS* 四个节点基因。生长素反应互作通路中 *ARFs* 在铁皮石斛中表达量高于美花石斛，美花石斛缺失 *ARF18* (LOC110110803) 节点基因，而且特异性拥有一条 *NAC* 基因组成的生长素信号转导靶基因蛋白互作通路 (图 7, 图 8)。



A: 与花型形成 (MADS-box)、生长素、乙烯反应有关蛋白互作通路; B: 与生长素反应有关通路。  
A: Protein interaction pathways related to floral type formation (MADS-box) and auxin response;  
B: Protein interaction pathways related to the auxin response.

图 7 铁皮石斛靶基因蛋白互作通路图

Fig. 7 Diagram of target gene protein interaction pathways in *D. officinale*



A: 与花型形成 (MADS-box) 有关基因蛋白互作通路; B: 与生长素反应有关通路; C: 与生长素 (NAC) 有关通路。

A: Protein interaction pathways related to floral type formation (MADS-box) and auxin response;  
B: Protein interaction pathways related to the auxin response; C: Pathways related to auxin.

图 8 美花石斛靶基因蛋白互作通路图

Fig. 8 Diagram of target gene protein interaction pathways in *D. loddigesii*

### 3 讨论

根据前人研究, MADS-box 家族基因在调控花型形成中发挥重要作用, 其中 AP3 亚家族作为 ABCDE 模型的 B 类基因具有调控多元化花被片和唇瓣的功能<sup>[22]</sup>, 包括 AP3-1、AP3-2 和 AP3-3 等 3 个进化枝, AP3-3 通常只在花瓣中特异性高表达并作为身份特征基因, 是石斛兰的花器官发育的重要基因<sup>[23]</sup>。根据转录组数据分析显示, 一个在美花石斛中上调表达的 AP3-3 基因和在铁皮石斛中上调表达的 AP3-2 基因或许是致使 2 种石斛花型和唇瓣结构差异的关键基因。此外已有研究表明, 意大利兰和水稻的花序中 miR5179 同源物靶向 AP3 转录本<sup>[4-5]</sup>, 表明在花器官发育过程中存在 miRNA 介导的 AP3 花发育调控机制, 且在 miRNA-mRNA 调控网络中, miR5179 在铁皮石斛上调表达并靶向 MADS-box B 类基因 AP3-3、AP3-2, 因此认为 AP3 的差异表达可能与 miR5179 的差异调控有关, 说明石斛兰中同样存在 miR5179 靶向 AP3 基因表达的现象, miR5179 可能是石斛花型发育的关键差异调控分子, miR5179-AP3 花型发育调控机制可能是石斛兰花型形成 mRNAs/microRNAs 调控网络的重要组成部分。

ANT 作为一个 A 类 AP2 同源基因可促进花瓣细胞的特性, 参与花器官的起始和发育, 维持细胞的分生组织能力, 在器官发生过程中维持细胞周期调节因子的表达, 从而通过控制细胞数量调控花器官大小, 参与花器官发育调节 INO 的自诱导和表达模式调节花器官发育, 并介导花模型 2 轮中的 AG 基因的下调<sup>[24]</sup>。本研究一个在铁皮石斛特异性表达的 miR167 靶向差异显著基因 ANT, 表明 2 种石斛 ANT 的差异表达可能与该 miRNA 的缺失有关, 因此认为 miR167-ANT 可能

是花器官发育的关键通路。

此外部分激素有关基因也与花型形成有关。NAC 基因具有调控生长素合成的作用, 本研究中存在差异表达的 NAC021, 是生长素信号转导转录激活因子, 在拟南芥 NAC1 转导 TIR1 (生长素受体蛋白) 下游的生长素信号, 可激活 2 个下游生长素应答基因 DBP 和 AIR3 的表达<sup>[25]</sup>。在铁皮石斛的 PPI 网络中 TIR1 与 UFO (花叶分生组织特性因子) 互作, 而 UFO 与 4 个 AP3 基因互作, 包括差异表达的 AP3-2、AP3-3, 所以 NAC021 基因作为生长素调控通路的关键基因可能间接影响了 AP3 基因的表达, 从而在 2 种石斛花型形成过程发挥作用。已知在核桃等其他园艺植物中 miR164 靶向 NAC 家族基因的表达<sup>[26]</sup>, 本研究 miRNA-mRNA 调控网络中差异表达的 miR164 靶向 NAC021 基因, 表明在兰科植物中同样存在 miR164-NAC 调控机制。

MYB 家族基因 GAM1 为大麦 GAMYB 同源转录因子, 是糊粉蛋白细胞中赤霉素依赖性淀粉酶表达的转录激活因子, 可能与淀粉酶启动子的 5'-TAACAAA-3' box 结合参与花粉和花器官的发育<sup>[27]</sup>。miR159 是植物中一类古老保守的 microRNA, 其靶基因主要是一类编码 R2R3 MYB 转录因子的 GAMYB-like 基因。miR159-GAMYB 途径高度保守, miR159 通过转录后调控 GAMYB 在植物花器官发育中发挥着重要作用<sup>[28]</sup>。本研究中差异表达的 miR159 靶向调控了 2 个差异显著的 GAM1, 说明 2 种石斛中存在 miR159-GAMYB 花器官发育调控机制, miR159 可能通过靶向 GAM1 的表达从而调控石斛兰的花器官发育, 影响花型形成。

细胞分裂素脱氢酶 (CKX) 对 CK 具有强底物专一性, 是目前已知的唯一参与 CK 降解过程

的酶,已有研究表明,CKX在植物体内以多基因家族的形式存在,在系统进化树上可分为4组,但不同的CKX基因家族成员都包含FAD和Cytokinin两个保守的结合域<sup>[29]</sup>,在本研究关联分析中差异表达的bdi-miR159c靶向CKX9,使该基因在铁皮石斛中上调表达。生长素响应因子参与的TIR1/AFB-Aux/IAA-ARF信号通路是植物体内最重要的信号通路之一,ARF家族成员在信号通路中的表达可以调控植物体内如花器官发育等多种生物学过程<sup>[30]</sup>,参与花器官的发育差异表达的miR160-ARF(Auxin响应因子),在苹果、拟南芥中均有体现<sup>[8-9]</sup>,这与本研究结果一致。

MADS-box蛋白互作差异可能导致石斛兰花型差异的关键,2种石斛中均存在4个B类(AP3)花源性基因MAD16并与花叶分生组织特性因子(UFO)互作,其中存在差异表达的节点AP3-3、AP3-2,且这2个节点在miRNA-mRNA调控网络中被miR5179靶向。研究表明许多激素信号通路直接或间接参与花器官发育调控,目前研究发现多种激素都是MADS-box的潜在靶点,直接或者间接参与植物生长发育、花器官形态建成等过程。在铁皮石斛中存在花模式和激素反应有关基因构成的调控网络,CUL1可与F-box蛋白形成SCF复合物,该复合物在花器官发育和生长素反应过程中发挥调控作用<sup>[31]</sup>,且在铁皮石斛PPI互作网络中F-box蛋白UFO和TIR1(生长素受体蛋白)与CUL1为互作关系。SCF(CUL1-UFO)复合物正向调控B类(AP3)花源性基因,SCF(CUL1-TIR1)复合物作为生长素受体介导Aux/IAA蛋白的蛋白酶降解和调控生长素因子的转录,这与本研究结果一致,美花石斛PII网络中则缺少CUL1、TIR1、TIR1A、RBS基因,这可能是其花型存在差异的原因之一。此外ARFs互作通路中美花石斛缺少节点ARF18(LOC110110803),铁皮石斛则缺少NAC互作通路,PPI网络中AP3、ARFs、NAC021等节点均在mRNA-miRNA调控网络显示。

综上所述,本研究借助生物信息学成功筛选并构建了2种石斛的miRNA-mRNA网络和PPI网络,发现2种石斛与花型形成有关的关联网络和蛋白互作关系,探讨了可能与花型形成有关的分子发育机制,为今后阐明石斛属植物花型形成的分子调控机制提供重要的线索,为分子植物育种提供数据支撑和参考依据。此外本研究存在一

些不足,由于筛选条件的限制,只能根据前人研究对关键mRNA和miRNA进行分析,研究结果具有局限性;缺乏证明miRNA-mRNA调控网络中靶向关系验证实验。在后续的研究中应通过相关实验进一步讨论和验证本研究的预测。

## 4 结论

从铁皮石斛、美花石斛分析发现的miR5179-AP3、miR167-ANT、miR164-NAC、miR159-GAMYB、miR159-CKX、miR160-ARF关联通路可能是石斛属植物花型差异的关键miRNA-mRNA通路。其通路中的部分基因如AP3、ARF、NAC则是PPI网络中的关键节点。以上miRNA、mRNA共同构成分子调控网络调控石斛的花型差异。

## 参考文献

- [1] HSU H F, HSU W H, YUNG I L, WAN T M, JUN Y Y, JEN Y L, CHANG H Y. Model for perianth formation in orchids[J]. Nature Plants, 2015, 1(5): 15046.
- [2] GANG W, HANG Z. Plant microRNAs and development[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013(5): 217.
- [3] AXTELL M J. Classification and comparison of small RNAs from plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 137-159.
- [4] ACETO S, SICA M, PAOLO S D, D'AEGENIO V, CANTIELLO P, SALVATORE F, GAUDIO L. The analysis of the inflorescence miRNome of the orchid orchis italica reveals a DEF-like MADS-Box gene as a new miRNA target[J]. PLoS One, 2014, 9(5): 215-225.
- [5] XIAO H, WANG Y, LIU D, WANG W, LI X, ZHAO X, XU J, ZHAI W, ZHU L. Functional analysis of the rice AP3 homologue OsMADS16 by RNA interference[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(5): 957-966.
- [6] FRANCOIS L, VERDNAUD M, FU X, RULEMAN D, DUBOIS A, VANDENBUSSCHE M, BENDAHMANE A, RAYMOND O, JUST J, BENDAHMANE M. A miR172 target-deficient AP2-like gene correlates with the double flower phenotype in roses[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-11.
- [7] ZHAO L, KIM Y, DINH T, CHEN X. miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems[J]. The Plant Journal, 2007, 51(5): 840-849.
- [8] SHEN X, HE J, PING Y, GUO J, HOU N, CAO F, LI X, GENG D, WANG S, CHEN P, QIN G, MA F, GUAN Q. The positive feedback regulatory loop of miR160-Auxin response factor 17-HYPONASTIC LEAVES 1 mediates drought tolerance in apple trees[J]. Plant Physiology, 2022,

- 188(3): 1686-1708.
- [9] RHOADES M W, REINHART B J, LIM L P, BURGE C B, BARTEL B, BARTEL D P. Prediction of plant microRNA targets[J]. *Cell*, 2002, 110(4): 513-520.
- [10] HENDELMAN A, STAV R, ZEMACH H, ARAZI T. The tomato NAC transcription factor SINAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(18): 5497-5507.
- [11] YANG F, ZHU G, WANG Z, LIU H, XU Q, HUANG D, ZHAO C. Integrated mRNA and microRNA transcriptome variations in the multi-tepal mutant provide insights into the floral patterning of the orchid *Cymbidium goeringii*[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 1-24.
- [12] YANG D, CHEN F Z Q, YANG L, HOU B, YANG J, LI X N, ZI C T, DONG F W, LIU Z H, ZHOU J. Seco-dendrobine-type alkaloids and bioactive phenolics from *Dendrobium findlayanum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(2): 227-235.
- [13] NG T B, LIU J, WONG J H, YE X, STEPHEN C W S, TONG Y, ZHANG K Y. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 1795-1803.
- [14] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 19 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 104-117. Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China: Vol. 19*[M]. Beijing: Science Press, 1999: 104-117. (in Chinese)
- [15] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, BOTSTEIN D, CHERRY J M. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [16] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, CHANG T C, MENDELL J T, SALZBERG S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295.
- [17] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [18] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Suppl. 2): 29-37.
- [19] LIAO Y, SMYTH G K, WEI S. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. *Bioinformatics*, 2013, 30(7): 923-930.
- [20] DEWEY C N, LI B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [21] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [22] ACETO S, GAUDIO L. The MADS and the beauty: genes involved in the development of orchid flowers[J]. *Current Genomics*, 2011, 12(5): 342-356.
- [23] 张婷, 邢妮, 王超, 刘虎岐. 小花草玉梅正常和自然变异植株的 *AP3-3* 基因研究[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(2): 231-240. ZHANG T, XING N, WANG C, LIU H Q. Cloning and sequence analysis of *AP3-3* gene in normal plant and natural variant from *Anemone rivularis* var. *flore-minore*[J]. *Northwest Journal of Botany*, 2016, 36 (2): 231-240. (in Chinese)
- [24] MIZUKAMI Y, FISCHER R L. Plant organ size control: aintegumenta regulates growth and cell numbers during organogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(2): 942-947.
- [25] XIE Q, FRUGIS G, COLGAN D, CHUA N H. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(23): 3024-3036.
- [26] 亢超. 核桃 miR164 及其靶 NAC 家族基因鉴定与相关基因在成花过程中的表达分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2022. KANG C. Identification of miR164 and its target NAC family genes and expression analysis of related genes during flower formation in walnut[D]. Shihezi: Shihezi University, 2022. (in Chinese)
- [27] WATTS R J, GUBLER F, KEYS M, MATTHEWS P, KALLA R, JACOBSEN J V. Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GA-Myb[J]. *Plant & Cell Physiology*, 38(3): 362-365.
- [28] 黎猛, 陈跃, 胡凤荣. miR159-GAMYB 途径调控植物生长发育的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(9): 234-247. LI M, CHEN Y, HU F R. Research progress in miR159-GAMYB regulating plants growth and development[J]. *Bio-tech Bulletin*, 2021, 37(9): 234-247. (in Chinese)
- [29] 王玲, 高彬, 温超, 郝琳, 刘凤栾, 马男, 赵梁军. 狗蔷薇细胞分裂素氧化酶基因 *RcCKX5* 的克隆及表达分析[J]. *园艺学报*, 2014, 41(7): 1418-1426. WANG L, GAO B, WEN C, XI L, LIU F L, MA N, ZHAO L J. Isolation and expression analysis of cytokinin dehydrogenase gene *RcCKX5* in *Rosa canina*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(7): 1418-1426. (in Chinese)
- [30] 蒋存钰, 申彦华, 王义, 张美萍, 孙春玉. 生长素响应因子 ARF 研究进展[J/OL]. *分子植物育种*, 2022: 1-8. (2022-12-16)[2023-01-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221215.1726.015.html>. JIANG C Y, SHEN Y H, WANG Y, ZHANG M P, SUN C Y. Research progress of auxin response factor in plants[J]. *Molecular Plant breeding*, 2022: 1-8. (2022-12-16) [2023-01-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221215.1726.015.html>. (in Chinese)
- [31] ZOU Y, MI J, CUI J, LU D, ZHANG X, GUO C, GAO G, LIU Q, CHEN B, SHAO C, GONG Y. Characterization of nuclear localization signal in the N terminus of CUL4B and its essential role in cyclin E degradation and cell cycle progression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(48): 33320-33332.