

不同开花期金银花 *Hsp70* 基因相关 miRNA 的表达研究

朱凤洁^{1,2}, 刘娟², 袁媛^{2*}, 周骏辉², 俞年军^{1*}, 黄璐琦²

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

摘要: 植物花期调节是其适应逆境的重要机制, 热休克蛋白 *Hsp70* (heat shock protein 70) 家族是抵抗胁迫的主要分子伴侣之一; 在花期的基因调控网络中, miRNA 可以作为负调控因子参与转录后基因表达调控。本文通过生物信息学方法, 从金银花转录组中获得一条 *Hsp70* 基因并结合金银花 miRNA 库获得一条可能靶向 *Hsp70* 基因的新型 miRNA。分别对获得的 *Hsp70* 基因和 miRNA 进行生物信息学及在不同开花期的表达进行分析。系统进化树显示获得的 *Hsp70* 基因与水稻、拟南芥中的 *Hsp110* 亚家族聚为一类; miRNA 二级结构预测显示其结构稳定, 可靠性高; miRNA 与 *Hsp70* 基因的结合位点图显示 miRNA 与 *Hsp70* 基因碱基互补中存在两个碱基错配; 表达分析显示 *Hsp70* 基因与 miRNA 在不同花期中表达量趋势相反, 说明 miRNA 可能调控 *Hsp70* 参与金银花的花发育阶段。本研究为金银花花期调控、响应环境胁迫等机制研究提供新的思路。

关键词: 金银花; miRNA; 热休克蛋白; 实时荧光定量

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1202-07

Expression analysis of *Hsp70*-related miRNA in *Lonicera japonica* Thunb. during different flowering stages

ZHU Feng-jie^{1,2}, LIU Juan², YUAN Yuan^{2*}, ZHOU Jun-hui², YU Nian-jun^{1*}, HUANG Lu-qi²

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. National Resource Center for Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Plant flowering regulation is an important mechanism to response to environmental stress. Heat shock protein 70 family is one of the main molecular chaperones to resist stress; miRNA can be used as a negative regulator to participate in post-transcriptional gene in flowering network. In this paper, we obtained an *Hsp70* gene from *Lonicera japonica* transcriptome and combined with *Lonicera japonica* miRNA library to obtain a novel miRNA that may target *Hsp70* gene through bioinformatics method. Bioinformatics and expression during different flowering stages of the obtained *Hsp70* gene and miRNA were analyzed. Phylogenetic tree showed that the obtained *Hsp70* gene was clustered with *Hsp110* subfamily in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. The prediction of miRNA secondary structure showed its stable structure and high reliability. The binding site map showed that there were two base mismatches between sequences of miRNA and *Hsp70* gene. The expression analysis showed that the expression of *Hsp70* and miRNA in different flowering stages had opposite trends, indicating that miRNA might regulate *Hsp70* to participate in the flowering stages of *Lonicera japonica*. This study provided new ideas for *Lonicera japonica* flowering regulation and response to environmental stress mechanisms.

Key words: *Lonicera japonica*; miRNA; Heat shock protein 70; qRT-PCR

收稿日期: 2018-04-27; 修回日期: 2018-06-12.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (ZZ10-008).

*通讯作者 Tel: 86-10-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com; 445882984@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0389

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花^[1], 是我国常用大宗药材。由于金银花的花蕾期、盛花期和败花期时绿原酸、芦丁等成分存在显著差异^[2], 因此开展金银花花期调控研究将为进一步控制金银花质量奠定理论基础。

植物花期调节是其适应逆境的重要机制之一, 即适宜的开花时间能使植物达到最强的适应性和生殖能力^[3]。在花期的基因调控网络中, miRNA 是一类长度为 20~25 bp 的非编码内源性小分子单链 RNA, 可以作为负调控因子参与转录后基因表达调控^[4], 如 miRNA 参与调控了青梅雌蕊发育^[5]、木绣球花可育性^[6]、苹果花蕾形成^[7]等。本实验室已建立了不同品种、不同产地的金银花 miRNA 数据库, 并获得了参与调控花蕾脂肪酸代谢的 miRNA, 推测其与金银花品种间成分的差异有关^[8]。

除品种外, 干旱^[9,10]、紫外^[11]、盐^[12]等环境胁迫对金银花花蕾发育以及次生代谢产物的积累也具有重要影响。作为与环境胁迫密切相关的保护性蛋白, 热休克蛋白 Hsp70 (heat shock protein 70) 家族是抵抗胁迫的主要分子伴侣之一^[13]。目前已发表的植物 Hsp70 研究主要集中在基因功能和对照胁迫的响应机制等^[14], 但有关 miRNA 调控 Hsp70 基因表达的研究还鲜有报道。本文拟通过对 Hsp70 及其相关 miRNA 的生物信息学分析, 结合不同花期金银花 Hsp70 及其相关 miRNA 的表达情况, 为金银花花期调控、响应环境胁迫等机制研究提供新的思路。

材料与方法

仪器 Light Cycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司), DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪 (北京市六一仪器厂), 5810R 型低温冷冻离心 (Eppendorf 公司), MM400 型混合型球磨机 (Retsch 公司), 紫外凝胶成像分析仪 (英国 Syngene 公司, 型号 GBOXHR)。

材料 不同花期的金银花样本采于中国中医科学院院内, 经金艳鉴定为金银花 *Lonicera japonica* Thunb., 采集后用灭菌水清洗擦干, 立即放入液氮, 于 -80 °C 冰箱保存 (图 1), 凭证标本号为 Beijing201705LJ-1~3, 保存在中国中医科学院中药资源中心。

植物 RNA 纯化试剂 (Invitrogen); TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒; miRcute miRNA 提取分离试剂盒 (TIANGEN); miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN); miRcute 增强型 miRNA 荧光

定量检测试剂盒 (TIANGEN); SYBR II 荧光定量酶; 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇等试剂购自天津市永大化学试剂有限公司, 均为国产分析纯。



Figure 1 Different flowering stages of *Lonicera japonica*. a: Budding stage; b-f: Full-bloom stage; g-h: Late flowering stage

金银花 *Hsp70* 基因的获得及生物信息学分析从金银花转录组数据库 (本实验室保存) 中的 KEGG 注释中搜索 *Hsp70* 关键词, 获得金银花 *Hsp70* 基因的序列号, 根据基因的序列号从转录组数据库中调取相应 *Hsp70* 基因的序列。使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测 *Hsp70* 基因序列的开放阅读框序列, 利用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 软件进行蛋白质结构域功能分析。利用 ExPasy 工具 (<https://web.expasy.org/protparam>) 进行氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点和亲、疏水性的在线分析; 利用 ExPasy 工具中的 SOPMA 软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 在线预测分析 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲; 使用 WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) 进行蛋白质亚细胞定位信号的预测; 利用 MEGA 5.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, Bootstrap 值为 1000, 其他参数使用默认值。

金银花 *Hsp70* 基因相关 miRNA 的获得及生物信息学分析 利用 Target Finder 软件根据获得的 *Hsp70* 基因序列号结合金银花 miRNA 库 (本实验室保存) 中的靶基因预测结果, 筛选可能靶向 *Hsp70* 基因并高表达的 miRNA, 获得 miRNA 的成熟体和前体序列。采用 RNAfold 软件^[15]对 miRNA 前体序列进行二级结构预测折叠, 同时获得其最小自由能。统计 miRNA 的前体序列长度、GC 含量, 并参照文献计算该前体序列自由能指数^[16]。采用 Photoshop 绘制 miRNA 与 *Hsp70* 基因的结合位点图。

金银花总 RNA、miRNA 的提取及逆转录 取冻存的样品经液氮研磨成粉, 使用植物 RNA 纯化剂 (Invitrogen) 试剂提取金银花叶片及不同开花期金银花总 RNA。按照 TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒步骤将总 RNA 反转录成 cDNA。

取冻存的样品经液氮研磨成粉, 按照 TIANGEN 公司 miRcute miRNA 提取分离试剂盒中组织或细胞中 miRNA 富集部分的提取步骤提取样品 miRNA。按照 TIANGEN 公司 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒步骤将 miRNA 反转录成 cDNA。

Hsp70 基因及相应 miRNA 的实时荧光定量特异引物设计 应用引物设计软件 Primer Premier 6.0 设计引物。参照文献^[17]引物设计原则设计靶基因引物; miRNA 上游引物设计原则: ① 遵循引物设计的普遍原则; ② 以成熟的 miRNA 序列为基础, 将 U 替换成 T; ③ T_m 在 65 ± 5 °C; ④ 若按照上述方式直接设计的引物 T_m 值过低, 可以在引物的 5' 端添加几个碱基 (最好为 G 或 C 碱基) 调整 T_m , 但应避免引入二级结构; ⑤ 若按照上述方式直接设计的引物 T_m 值过高, 可以在引物的 5' 端或 3' 端去掉几个碱基。Hsp70 基因、miRNA 的特异性引物序列与内参基因 Actin 引物序列^[18]、内参 miRNA U3868172 引物序列^[19]见表 1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。miRNA 荧光定量下游引物由 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (TIANGEN) 提供。

Table 1 Hsp70 gene and miRNA primer sequences

	Gene name	Primer type	Primer sequence (5'-3')
miRNA	novel-mir-102	Forward	CGGCGTCGTCATTGCACCAC
	U3868172	Forward	GCAATTAGCACCCCTGGAC
Hsp70	Unigene 47960	Forward	CCTCGTTGGTGGTCAGACTCGT
		Reverse	TGGCTGTGCTTGGTCGGGATAG
Actin		Forward	ATGATGCTCCAGGGCAGTTT
		Reverse	TCCATGTCATCCAGTTGCTG

实时荧光定量检测 mRNA 的表达 以 Total RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 每组设 3 个重复, 在 Light Cycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增及熔解曲线分析。20 μ L 反应体系: 10 μ L SYBR II 荧光定量酶, 正反向引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2.5 μ L, ddH₂O 6.7 μ L。扩增程序如下: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 34 s (每次循环后采集荧光信号), 40 个循环; 94 °C 变性 10 s, 65~95 °C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上

升, 停留 5 s, 获得基因的 Ct 值进行相对定量分析。

实时荧光定量检测 miRNA 的表达 以 miRNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 每组设 3 个重复, 在 Light Cycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增及熔解曲线分析。20 μ L 反应体系: 10 μ L 2 \times miRcute Plus miRNA Premix (with SYBR), 正反向引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。扩增程序如下: 起始模板变性 95 °C 15 min; 富集低丰度目标 miRNA (无需收集荧光信号) 94 °C 20 s, 64 °C 30 s, 72 °C 34 s, 共 5 个循环; PCR 循环中模板变性 94 °C 20 s, 退火以及延伸 60 °C 34 s, 共 45 个循环。

数据处理 以花蕾期 (c) 作为对照组目的基因, 根据 $Q = E^{-\Delta\Delta C_t}$, 利用 Excel 软件对每个扩增样品的 C_t 值计算各基因及 miRNA 的相对表达量 Q 。其中 E 为基因扩增效率 (一般情况下将扩增设为理想扩增, 扩增效率 E 默认为 2), $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 样品}} - C_{t \text{ 内参}}) - C_n$ ($C_{t \text{ 样品}}$ 为每个样品的目的基因 C_t 值, $C_{t \text{ 内参}}$ 为该样品内参基因的 C_t 值, C_n 为对照组目的基因与内参基因的 ΔC_t 值)^[20]。

结果与分析

1 金银花 Hsp70 基因的生物信息学分析

从金银花转录组数据库中的 KEGG 注释中搜索 Hsp70 关键词, 选取其中的 Hsp70 基因 Unigene 47960, 并获得相应序列。使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测 Unigene 47960 基因序列的开放阅读框序列, 结果显示 Unigene 47960 可编码 267aa 氨基酸; 利用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 软件对 Unigene 47960 进行蛋白质结构域功能分析, 结果表明 Unigene 47960 含有 Hsp70 家族结构域; 利用 ExPasy 工具分析显示, Unigene 47960 编码的蛋白相对分子质量为 28.881 kDa, 理论等电点为 5.10, 平均亲水系数 (GRAVY) 为 -0.465, 二级结构分析表明, Unigene 47960 的二级结构中 α -螺旋占 44.40%、 β -折叠占 9.33%、无规则卷曲占 29.48%、延伸链占 16.79%; 使用 WOLF PSORT 对 Unigene 47960 进行蛋白质亚细胞定位的信号预测, 结果表明 Unigene 47960 被定位在细胞质和线粒体中。

分别从 TAIR 网站 (<http://www.arabidopsis.org/>) 和 RGAP 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 下载拟南芥和水稻的 Hsp70 基因家族序列, 构建 Unigene 47960 和拟南芥、水稻 Hsp70 基因家族的系统进化树 (图 2)。根据文献报道, 在拟南芥和水

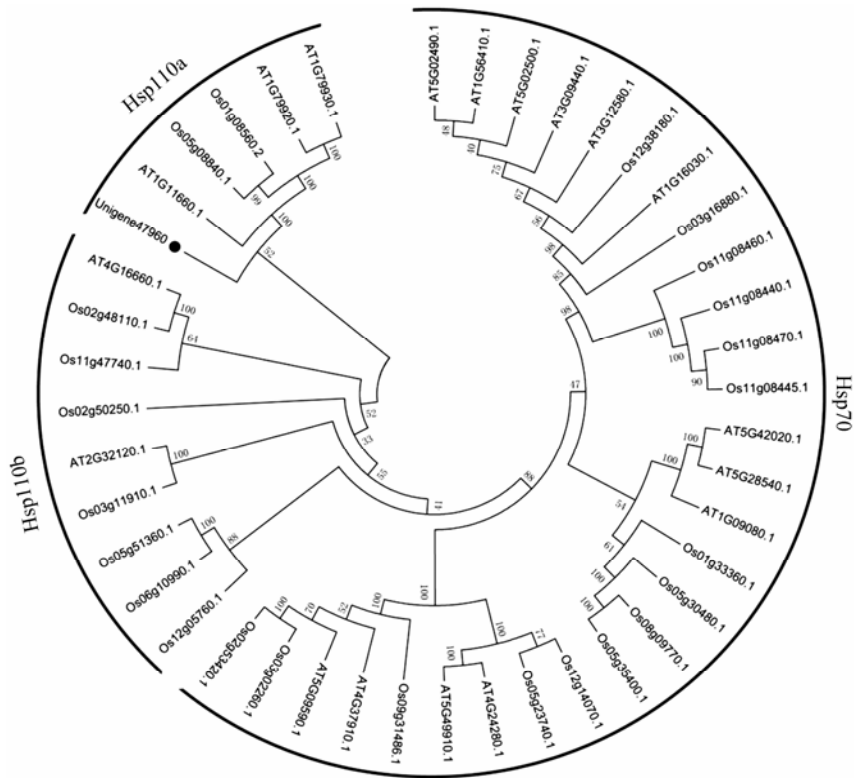


Figure 2 Phylogenetic relationships of *Hsp70* gene families from *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and Unigene 47960

稻中, *Hsp70* 基因家族成员分成 *Hsp70* 和 *Hsp110* 两个亚家族, 其中 *Hsp70* 又分为细胞质 *Hsp70*、内质网 *Hsp70*、线粒体 *Hsp70*、叶绿体 *Hsp70* 4 个小家族, *Hsp110* 根据亚细胞定位可分为细胞质型 *Hsp110a* 和内质网型 *Hsp110b*^[21, 22]。系统聚类树显示, Unigene 47960 与拟南芥、水稻中的 *Hsp110* 亚家族中细胞质型 *Hsp110a* 基因 AT1G11660.1、Os05g08840.1、Os01g08560.2、AT1G79920.1、AT1G79930.1 聚为一类, 结合 Unigene 47960 的亚细胞定位结果可进一步推测 Unigene 47960 属于 *Hsp70* 基因家族的 *Hsp110* 亚家族中的细胞质型 *Hsp70*。

2 金银花 *Hsp70* 基因相关的 miRNA 生物信息学分析

利用 Target Finder 软件根据获得的 Unigene 47960 结合金银花 miRNA 库 (本实验室保存) 中的靶基因预测结果, 获得了可能靶向 Unigene 47960 基因并高表达的 novel-mir-102, 同时调取 novel-mir-102 的成熟体和前体序列。运用 RNAfold 在线软件对 novel-mir-102 进行二级结构预测折叠 (图 3A) 并进行参数分析。结果表明, novel-mir-102 前体序列具有典型的茎环结构特征, 成熟序列位于 novel-mir-102 前体序列的 3'端, novel-mir-102 前体序列长度为 117, 其最小折叠自由能 (MFE) 为 $-61.81 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, GC% 为 49.6%,

最小折叠自由能指数 (MFEI) 为 1.07。由 Photoshop 绘制的 novel-mir-102 与 Unigene 47960 结合位点图 (图 3B) 可见, novel-mir-102 与 Unigene 47960 之间存在 3 个 G:U 摆动, 两个碱基错配。

MFE 和 MFEI 是区分 miRNA 与其他小分子 RNA 的重要参数, MFE 的值越低, 前体序列的二级结构热力学稳定性相应越高; miRNA 前体的 MFEI 应该大于 0.66, 以便同 tRNA (0.64)、rRNAs (0.59) 和 mRNA (0.62~0.66) 区分^[23]; 此外, 研究表明, miRNA 前体的 (A+U) 含量高于 (G+C) 含量能够使 miRNA 前体更加稳定^[23]。本研究所选 miRNA 的 MFE 和 MFEI 值均较高, 且 (A+U) 含量高于 (G+C) 含量; 并且 novel-mir-102 与 Unigene 47960 结合位点图符合 miRNA 与靶基因间不多于 4 个错配的原则^[24], 说明 novel-mir-102 的可靠性高。

3 金银花总 RNA 与 miRNA 质检结果

选取不同花期金银花提取总 RNA、miRNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测。由图 4A 中可见 3 条清晰的电泳条带, 其中上面两条分别为 28S 和 18S 核糖体 RNA, 最下面一条为更小稍微扩散的条带, 由相对分子质量低的 tRNA 和 5S 核糖体 RNA 组成, 图中可见 28S 和 18S 两条条带亮而浓, 且 28S 条带密度约为 18S 条带 2 倍, A_{260}/A_{280} 均在 1.80~2.00 之间, 提示

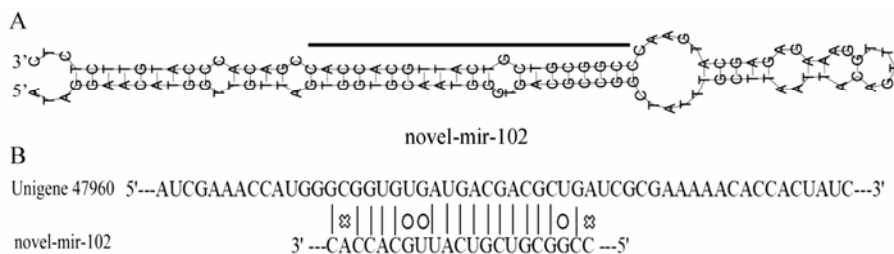


Figure 3 A: Secondary structure prediction of novel-mir-102 (Line coverage area is mature miRNA sequence); B: Unigene 47960 and novel-mir-102 binding site map. Vertical lines represent base complements, circles represent G:U swings, and crosses indicate base mismatches

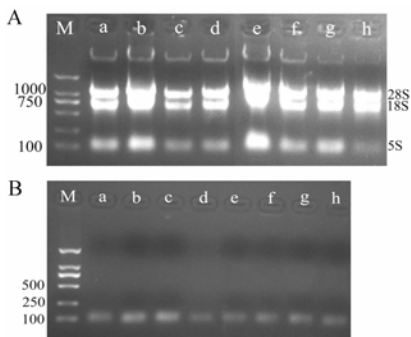


Figure 4 Agarose gel electrophoresis. A: Agarose gel electrophoresis of total RNA; B: Agarose gel electrophoresis of miRNA; M: Marker; a: Budding stage; b-f: Full-bloom stage; g-h: Late flowering stage

组织 RNA 完整性较好, 能够满足 qRT-PCR 的实验; 图 4B 可见, 由试剂盒提取的 miRNA 条带清晰, 而且都富集, 能够用于常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 等后续研究。

4 花期对金银花 *Hsp70* 基因及相关 miRNA 表达水平的影响

为了进一步了解 Unigene 47960 与 novel-mir-102 间的作用情况, 分别对不同花期 Unigene 47960 和 novel-mir-102 相对表达量进行分析。由图 5 可见, Unigene 47960 在盛花期 e、f 阶段的转录水平显著低于幼蕾、败花期, 推测其主要在金银花幼蕾和败花期阶段发挥功能。同时 novel-mir-102 与 Unigene 47960

在金银花不同花期中表达水平呈相反趋势, 推测 novel-mir-102 可能参与调控金银花 Unigene 47960 的表达。

讨论

花蕾是金银花的主要药用部位, 有效控制花蕾的生长发育是丰富金银花产量、提高质量的重要环节。miRNA 作为许多基因表达的关键调控因子, 能够参与植物从营养生长阶段到生殖生长阶段的转化^[25-28]。前期研究表明, 环境胁迫对金银花花蕾的发育和次生代谢产物的积累也具有重要的调控作用^[9-12], *Hsp70* 基因在非生物胁迫环境的应答、抗病性及植物发育中扮演重要角色^[29]。本研究通过从金银花转录组数据库中选取的金银花 *Hsp70* 基因 (Unigene 47960) 结合金银花 miRNA 库筛选出 novel-mir-102, 分别对 Unigene 47960 和 novel-mir-102 进行生物信息学分析。系统进化树显示 Unigene 47960 与拟南芥、水稻的 *Hsp110* 亚家族聚为一类, 研究显示, AT1G11660.1、Os05g08840.1、Os01g08560.2、AT1G79920.1、AT1G79930.1 在拟南芥和在水稻中可能涉及营养器官的发育、花发育^[21]等多种功能, 由此推测与这些基因聚为一类的 Unigene 47960 可能参与金银花的花发育过程。

目前对于金银花 miRNA 已有初步研究^[8], 但

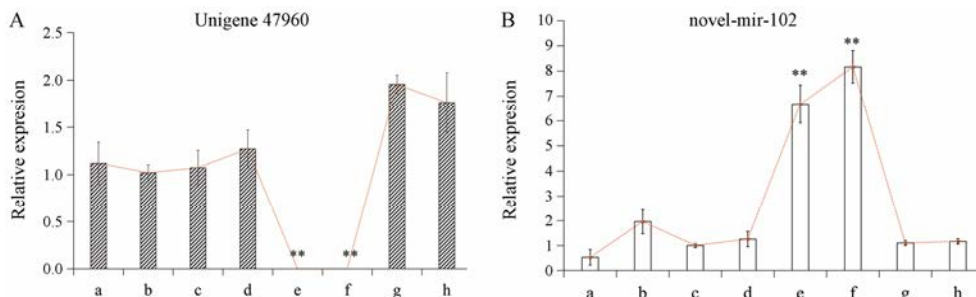


Figure 5 The expression trend of novel-mir-102 and Unigene 47960 in different flowering stages of *Lonicera japonica*. a: Budding stage; b-f: Full-bloom stage; g-h: Late flowering stage; ***P* < 0.01 vs a, b, c, d, g, h flowering stages

miRNA 与 *Hsp70* 基因的相互作用影响金银花等药用植物生长发育的研究还未有报道。本研究对 *Hsp70* 基因及相关 miRNA 在金银花不同花期的表达量变化和趋势进行分析, 结果进一步说明 novel-mir-102 可能靶向 Unigene 47960 参与金银花的花发育。后期可继续对 miRNA 及其靶基因如何相互作用及靶基因功能等进行深入研究, 以期为金银花花期调控、响应环境胁迫等机制研究提供新的思路。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 294.
- [2] Qin SS, Yuan Y, Hu GQ, et al. Comparison of the content of effective components of *Lonicera japonica* and its varieties [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 81–82, 86.
- [3] Amasino R. Seasonal and developmental timing of flowering [J]. Plant J, 2010, 61: 1001–1013.
- [4] Zhu FJ, Liu J, Yu NJ, et al. Progress on miRNA-based secondary metabolism regulation in medicinal plants [J]. Chem Life (生命的化学), 2017, 37: 1056–1064.
- [5] Wang W, Shi T, Ni X, et al. The role of miR319a and its target gene TCP4 in the regulation of pistil development in *Prunus mume* [J]. Genome, 2018, 61: 43–48.
- [6] Li W, He Z, Zhang L, et al. miRNAs involved in the development and differentiation of fertile and sterile flowers in *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* [J]. BMC Genomics, 2017, 18: 783.
- [7] Xing L, Zhang D, Zhao C, et al. Shoot bending promotes flower bud formation by miRNA-mediated regulation in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14: 749–770.
- [8] Liu J, Yuan Y, Wang Y, et al. Regulation of fatty acid and flavonoid biosynthesis by miRNAs in *Lonicera japonica* [J]. RSC Adv, 2017, 7: 35426–35437.
- [9] Xie DF. Responses to Soil Drought-rehydration on Photosynthetic Characteristics of *Lonicera japonica* (金银花对土壤干旱—复水的光合生理响应) [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017.
- [10] Liang H. Effect of Drought Stress on Physiological Characteristics and Yield and Quality of *Lonicera macranthoides* (干旱胁迫对灰毡毛忍冬生理特性及产量和质量的影响) [D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [11] Ning W. Studies on Intervention in Secondary Metabolites in *Lonicera japonica* Thunb. and *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. in Response to the Technology of Ultraviolet Induction (紫外诱导技术对中药金银花与十大功劳次生代谢物的干预研究) [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [12] Li SH. Physiological Analysis of Sale-tolerant Honeysuckle (*Lonicera japonica*) and ITS Amelioration Functions in Addition to Exogenous $K_2SiO_3 \cdot nH_2O$ (药用金银花耐盐生理分析及外源硅对胁迫的缓解效应) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [13] Qi Y, Xu ZS, Li PS, et al. Research progress on molecular mechanism and application of HSP70 in plants [J]. J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报), 2013, 14: 507–511.
- [14] Li DB, Gao YH, Si JP, et al. Cloning and expression analysis of *Hsp70* gene from *Dendrobium officinale* under low temperature stress [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 507–511.
- [15] Lorenz R, Bernhart SH, Honer Zu, C et al. ViennanRNA Package 2.0 [J]. Algorithm Mol Biol, 2011, 6: 26.
- [16] Li JL. *Beta vulgaris* microRNAs Bioinformatics Prediction and Salt-tolerant miRNA Expression Analysis (甜菜 miRNA 生物信息学预测及耐盐相关 miRNA 表达分析) [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [17] Dong XM, Yuan Y, Zha LP, et al. Molecular ID for populations of *Dendrobium officinale* of Yunnan and Anhui Province based on SSR marker [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2017, 19: 617–624.
- [18] Jiang XH, Yuan J. Cloning and expression characterization of *LjCab* gene of the light harvesting chlorophyll a/b binding protein from *Lonicera japonica* Thunb. [J]. J Cent China Norm Univ Nat Sci (华中师范大学学报), 2016, 50: 409–414.
- [19] Wang YL. Screening of miRNA and SNP Markers in the Identification of *Lonicera japonica* (金银花产地鉴定 miRNA 及 SNP 标记的筛选) [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2016.
- [20] Ao Y, Zhao LL, Jiang CY, et al. Analysis on differential expression of microRNAs in different types of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Acta Agric Boreali Sin (华北农学报), 2014, 29: 16–22.
- [21] Chen X, Shi L, Zhu L, et al. Molecular evolution characteristics and expression pattern analysis of the heat shock protein 70 (*Hsp70*) gene superfamily in plant [J]. Genom Appl Biol (基因组学与应用生物学), 2017, 36: 4282–4294.
- [22] Chen XY, Xu RR, Xiong FQ, et al. Genomic-wide identification and bioinformatics analysis of *Hsp70* genes in *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis* [J]. Chin J Oil Crop Sci (中国油料作物学报), 2016, 38: 572–581.
- [23] Zhang BH, Pan XP, Cox B, et al. Evidence that miRNAs are

- different from other RNAs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 246–254.
- [24] Zhang B, Pan X, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 3753–3762.
- [25] Spanudakis E, Jackson S. The role of microRNAs in the control of flowering time [J]. *Exp Bot*, 2014, 65: 365–380.
- [26] Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to rome [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 2013–2037.
- [27] Wang JW, Czech B, Weigel D. miR156 regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 2009, 138: 738–749.
- [28] Wang C, Zhang YY, Fang JG, et al. Spatiotemporal expression of micro RNA156b and micro RNA172c and their target genes during flower development of winter buds growing on cut-back treated shoots of grapevine [J]. *J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报)*, 2012, 35: 59–64.
- [29] Du XH, Huang LL, Liu HC. Advance of heat shock protein 70 (*Hsp70*) in plant [J]. *J Henan Inst Sci Technol (河南科技学院学报)*, 2014, 42: 16–20.