

张丽杰, 李京泽, 段兴江, 等. *miR319b-JmGAMYB* 模块在胡桃楸花发育过程中的调控机制[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(6): 689–698.

ZHANG Lijie, LI Jingze, DUAN Xingjiang, et al. Regulation mechanism of the *miR319b-JmGAMYB* module during floral development in *Juglans mandshurica* Maxim.[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(6): 689–698.

miR319b-JmGAMYB 模块在胡桃楸花发育过程中的调控机制

张丽杰, 李京泽, 段兴江, 高悦, 李姝函, 纪英含

(沈阳农业大学 林学院/辽宁省林木遗传育种与培育重点实验室, 沈阳 110161)

摘要: 胡桃楸是一种应用前景十分广阔的本果材兼用的经济树种, 其雌雄同株异型异熟的生殖特性有效避免了自交, 但这种雌雄异型异熟的花发育调控机制尚未清楚。miR319 家族已经在多个物种中被鉴定为调节花芽分化的关键 miRNA 家族之一。前期试验已筛选出 *Jm-miR319b* 是调控胡桃楸花发育过程中的关键 miRNA, 而 *GAMYB* 基因被预测为 *Jm-miR319b* 的靶基因。为探索 *miR319-GAMYB* 模块对胡桃楸花发育的调控机制, 通过胡桃楸花芽转录组数据中 *GAMYB* 的 CDS 序列, 利用 RLM 5' RACE 技术验证 *Jm-miR319b* 与 *JmGAMYB* 基因的靶向关系; 通过 PCR 克隆出 *JmGAMYB* 基因的 CDS 序列全长并进行生物信息学分析; 利用 qRT-PCR 技术对靶基因 *GAMYB* 在胡桃楸不同器官和不同生殖类型的雌雄花芽表达模式分析。结果表明: *JmGAMYB* 基因 ORF 全长 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 花发育相关基因 *miR319b* 直接靶向 *JmGAMYB*, 其表达趋势相反, 切割位点在 *miR319b* 成熟体第 10~11 碱基; qRT-PCR 定量分析表明: *JmGAMYB* 基因在胡桃楸茎、叶、雌蕊、雄花序及果实中均有表达, 且在雄花序中表达量最高。 *JmGAMYB* 基因在生理分化期的雌先型和雄先型的雌、雄花芽表达量呈显著差异; 而在形态分化期的雄花序交替散粉时, *JmGAMYB* 基因表达量也交替出现高峰。因此, 推测 *miR319-JmGAMYB* 参与调控了胡桃楸花发育的全过程, 并且在花芽分化早期就已经开始起调控作用, 在雄花序散粉时相对表达量最高, 散粉后表达量开始降低。研究结果将为进一步探索胡桃楸花发育的分子调控机制奠定基础。

关键词: 胡桃楸; *miR319b-JmGAMYB*; 花发育; 表达分析

中图分类号: S792.132

文章编号: 1000-1700(2024)06-0689-10

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Regulation Mechanism of the *miR319b-JmGAMYB* Module During Floral Development in *Juglans mandshurica* Maxim.

ZHANG Lijie, LI Jingze, DUAN Xingjiang, GAO Yue, LI Shuhan, JI Yinghan

(College of Forestry/Key Laboratory of Forest Tree Genetics, Breeding and Cultivation of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: *Juglans mandshurica* Maxim. is a woody fruit and timber tree species with broad application prospects. Its reproductive characteristics of monoecious and heterodichogamous effectively avoid self-fertilization. However, the regulatory mechanism of heterodichogamous flower development remains unclear. The miR319 family has been identified as one of the key miRNA families regulating flower bud differentiation in multiple plants. Our research group has screened and identified *Jm-miR319b* as a crucial miRNA regulating the flower development process of *J. mandshurica*, and *GAMYB* has been predicted as a target gene of *Jm-miR319b*. In order to explore the regulatory mechanism of *miR319-GAMYB*

收稿日期: 2024-05-10

基金项目: 辽宁省科技厅应用基础研究计划项目(2022JH2/101300170)

第一作者: 张丽杰(1972-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事珍贵树种遗传改良和林业生物技术研究, E-mail: zlj330@syau.edu.cn

module on the flower development process of *J. mandshurica*, in this study, we screened the CDS sequences of *GAMYB* of *J. mandshurica* by transcriptome data, and verified the relationship of *Jm-miR319b* with the RLM 5'RACE technique. The target relationship between *Jm-miR319b* and *GAMYB* of *J. mandshurica* was verified using RLM 5'RACE technique. The full-length CDS of *JmGAMYB* gene was cloned by PCR gene amplification technique and analysed bioinformatically, and the expression of the target gene, *GAMYB*, was investigated in different organs and tissues and at different stages of development of the two reproductive types of *J. mandshurica* using qRT-PCR technique. The target gene *GAMYB* was analysed by qRT-PCR in different organ tissues of *J. mandshurica* and in different developmental periods of both reproductive types. The results showed that the *JmGAMYB* gene was 1503 bp in length, encoding 500 amino acids. *miR319b*, a gene related to floral development, was directly targeted to *JmGAMYB*, with the opposite expression trend, and the cleavage site was at bases 10-11 of the *miR319b* maturation body. qRT-PCR quantification showed that the *JmGAMYB* gene was expressed in the stem, stem, and stem buds of *J. mandshurica*, and in the male and female buds of both reproductive types. *JmGAMYB* gene was expressed in stems, leaves, male and female flowers, and fruits of *J. mandshurica*, and the highest expression was found in male flowers. *JmGAMYB* gene expression was significantly different in male and female flower buds of male and female precursors during the physiological differentiation stage, and the expression of the *JmGAMYB* gene also reached the highest peak when male and female flowers were alternately opened during the morphological differentiation stage. Therefore, it is hypothesized that *JmGAMYB* is involved in the whole process of floral development in *J. mandshurica* and starts to play a regulatory role at the early stage of bud differentiation, with the highest relative expression at the time of pollination of male flowers, and then the expression starts to decrease after pollination. The results of this study will lay a foundation for further exploration of the molecular regulation mechanism of flower development in *J. mandshurica*.

Key words: *Juglans mandshurica* Maxim.; floral development; *miR319b-JmGAMYB*; expression analysis

胡桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)为胡桃属(*Juglans*)落叶乔木^[1-2],具有重要的经济价值、药用价值、营养价值和观赏价值,应用前景十分广阔^[3-4]。胡桃楸为雌雄同株异型异熟植物,按其生殖过程中雌、雄花的开放时间顺序可以分为雌花先成熟个体和雄花先成熟个体两种类型^[5-6],即雌先型雌蕊开放时,雄先型雄花序正处于散粉阶段,而雌先型雄花序散粉时,雄先型雌蕊处于开放阶段,这种异型异熟的生殖过程能够有效避免自交现象的发生^[7-8]。植物从营养生长转向生殖发育,标志着童期结束^[9],在这个过程中不仅受到基因、染色体^[10-11]、环境因素^[12]的调控,同时也受到植物内源激素信号的调控,如赤霉素、生长素、乙烯等^[13]。赤霉素(GAs)属于四环二萜类植物激素,在植物营养生长和生殖生长中有重要的调控作用,尤其是在花发育及性别分化方面^[14]。在木本植物中,赤霉素在板栗(*Castanea mollissima*)^[15]、榛子(*Corylus heterophylla*)^[16]、落叶松(*Larix gmelinii*)^[17]等植物性别分化的研究中均有报道。*GAMYB*基因是R2R3-MYB基因家族成员,是赤霉素正调控因子,在赤霉素信号通路中对许多赤霉素诱导基因起关键调控作用^[18-20]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中*GAMYB*基因过表达可以改变花器官形态,并且能够结合LFY启动子调节开花时间^[21-22]。*GAMYB*在黄瓜(*Cucumis sativus*)中过表达可以影响性别分化^[23-24]。但目前该基因在胡桃楸花发育过程中的表达和功能尚未见报道。

MicroRNA(miRNA)是一类长度为18~24 nt的小型非编码RNA,在植物体内主要通过靶向互补序列,调控靶基因表达,从而控制许多生物学功能^[25-26]。研究表明miRNA在植物的花芽分化、果实发育、激素合成等方面有重要的调控作用^[27],在花发育及性别分化中也起到关键的作用^[28]。因此,近年来植物中越来越多的miRNA被鉴定,为miRNA的功能验证奠定了研究基础。miR319家族是植物体内一类保守的miRNA,在植物生长发育过程中的花器官发育、性别分化及激素信号传导方面发挥重要的调控作用^[29-31]。已有研究发现*miR319*可以靶向关键基因来调控拟南芥花药的发育^[32]。本课题组前期通过对胡桃楸生理分化期花芽进行miRNA测序,筛选出*Jm-miR319b*是花发育过程中的关键miRNA,而*JmGAMYB*被预测是*miR319b*的靶基因。为探索*Jm-miR319b-JmGAMYB*模块在胡桃楸花发育过程中的调控和表达模式,以雌先型和雄先型胡桃楸生理分化期的花芽为试验材料,通过PCR扩增获得

JmGAMYB 基因 CDS 序列并进行生物信息学分析;利用 RLM 5' RACE 技术鉴定 *miR319b* 和 *JmGAMYB* 基因的靶向关系;利用 qRT-PCR 荧光定量技术对 *Jm-miR319b-Jm GAMYB* 模块在胡桃楸不同器官及花芽不同发育时期的表达模式进行分析。研究结果将为 *Jm-miR319b-JmGAMYB* 模块后续的功能验证及对其他 miRNA-靶基因模块在胡桃楸花发育调控机制的研究提供理论支撑,同时为构建完整的胡桃楸花发育基因调控网络奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2023年春季在辽宁省实验林场胡桃楸母树林良种基地选取生理分化期(4月3日、4月11日、4月17日、4月24日、4月30日)和形态分化期(5月3日、5月12日、5月16日、5月19日、5月22日)胡桃楸雌、雄花芽以及幼嫩叶片、茎段、果实等器官用于基因克隆、定量表达分析。样品取后带回实验室,液氮速冻后保存于-80℃超低温冰箱。

1.2 方 法

1.2.1 RNA提取及cDNA合成 使用FastPure通用植物总RNA试剂盒(诺唯赞生物公司)提取胡桃楸基因组RNA,使用核酸蛋白仪(赛默飞)对其质量和纯度进行检测,利用Genstar公司反转录试剂盒合成cDNA。

1.2.2 *GAMYB*基因克隆及生物信息学分析 利用胡桃楸转录组数据设计*JmGAMYB*基因CDS序列PCR扩增引物(表1),引物由金唯智生物公司合成。以cDNA为模版,使用PCR反应25 μL体系:12.5 μL 2×UltraTaq PCR StarMix(Genstar)、9.5 μL ddH₂O、10 μmol·L⁻¹ F端引物 1 μL、10 μmol·L⁻¹ R端引物 1 μL、模版cDNA 1 μL。反应程序:98℃,3 min;95℃,30 s;55℃,30 s;72℃,1 min;35次循环,72℃,7 min。PCR产物经纯化回收,连接、热激转化、菌液检测,送苏州金唯智生物公司测序。

表1 胡桃楸*GAMYB*基因CDS扩增引物

Table 1 CDS amplification primers for the *JmGAMYB* gene of *J. mandshurica*

基因 Gene	扩增引物 Extension primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>GAMYB</i>	GAMYBCDS-F	ATGATGGGCACAGTGAACAAGAGT
	GAMYBCDS-R	TTAACGATGCTGTTTCTATTCCCAA

在NCBI中对胡桃楸花发育相关*JmGAMYB*基因进行同源性分析和蛋白质保守结构域预测;利用DNAMAN对*JmGAMYB*进行蛋白多序列比对,利用MEGA X软件对不同物种的*GAMYB*基因进行分析,以最大似然法构建系统进化树。

1.2.3 *miR319b*表达分析及其靶向关系鉴定 使用miRNA RTprimer对候选miRNA设计颈环引物,miRNA加尾反转录试剂盒(诺唯赞公司)和cDNA反转录试剂盒(康润生物公司)以胡桃楸花芽cDNA为模板,U6为内参基因,进行荧光定量qRT-PCR验证,分析*miR319b*在不同生殖类型雌雄花芽的表达模式。以Actin为内参,依据转录组数据筛选出的与花发育相关的关键靶基因*GAMYB*设计定量引物(表2),分析*JmGAMYB*基因的表达模式。并利用RLM 5' RACE试剂盒(Taraka)进一步验证*miR319b-JmGAMYB*基因的直接靶向关系。

表2 胡桃楸*miR319b-GAMYB*基因定量引物序列信息

Table 2 Sequence information for the *miR319b-GAMYB* gene quantification primer for *J. mandshurica*

基因 Gene	qRT-PCR引物 qRT-PCR Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>miR319b</i>	miR319-F	ATTCTATTCCATTGGTCTACTCGGGAGC
	miR319-R	GCGTTGGACTGAAGGGA
<i>GAMYB</i>	GAMYB-F	TAACCTGCCGCCTTCATT
	GAMYB-R	CCAACTTCATAGCCACAGAT
<i>Actin</i>	Actin-F	AGGAGCTGGAGAAGGAGCCCA
	Actin-R	AACAGCAACGGTCTGGCGCA
<i>U6</i>	U6-F	TGGTTCATTTCTGGGTCTT
	U6-R	CATCCGATAAAATTGGAACGA

1.2.4 *JmGAMYB*基因表达分析 使用诺唯赞荧光定量试剂盒进行qRT-PCR检测,按说明书进行避光、冰上操作。将胡桃楸各器官以及各个发育时期的花芽cDNA进行qRT-PCR检测,以*Actin*为内参基因,定量分析*JmGAMYB*基因在胡桃楸茎段、叶片以及生理分化期和形态分化期的雌、雄花芽的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *GAMYB*基因克隆

以胡桃楸花芽 cDNA 为模板,利用 *GAMYB* 基因上下游引物进行 PCR 扩增,获得长约 1 500 bp 特异性条带(图 1)。测序结果显示:*GAMYB* 基因 CDS 序列全长 1 503 bp,编码 500 个氨基酸(图 2),具有完整的 ORF 阅读框。

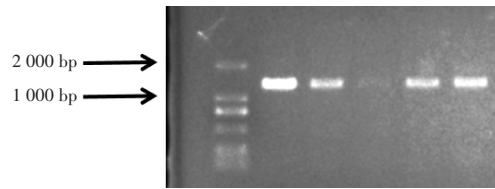


图 1 *GAMYB*基因PCR扩增

Figure 1 PCR amplification of the *GAMYB* gene

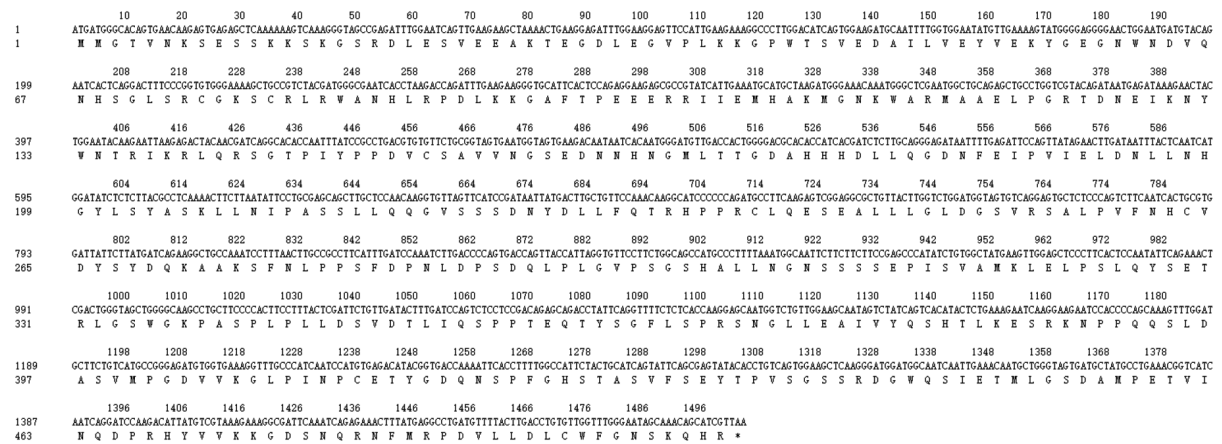


图 2 *GAMYB*基因CDS序列及氨基酸序列

Figure 2 CDS sequence and amino acid sequence of *GAMYB* gene

2.2 *JmGAMYB*基因氨基酸比对及系统进化树分析

将克隆获得的 *GAMYB* 基因 CDS 序列在 NCBI 数据库进行同源性分析,结果表明:*GAMYB* 基因与核桃(*Juglans regia*)、美国山核桃(*Carya illinoensis*)同源性高达 94% 以上,与英国栎木(*Alnus glutinosa*)、白栎(*Quercus lobata*)、夏栎(*Corylus avellana*)的 *GAMYB* 基因的同源性达到 81% 以上,与欧榛(*Corylus avellana*)同源性达到 79% 以上(表 3)。证明已经克隆获得胡桃楸 *GAMYB* 基因,将该基因命名为 *JmGAMYB*(登录号:PQ202048.1)。

表 3 *JmGAMYB*基因NCBI数据库Blast同源性比较

Table 3 Comparison of Blast homology of *JmGAMYB* gene NCBI database

基因 Gene	GeneBank 登录号 Gene bank accession	同源性/% Homology	植物种类 Plant species
<i>JrGAMYB</i>	XM_041139056.1	97.07	核桃 <i>Juglans regia</i>
<i>CiGAMYB</i>	XM_043103180.1	94.61	美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>
<i>AgGAMYB</i>	XM_062315627.1	82.17	英国栎木 <i>Alnus glutinosa</i>
<i>QiGAMYB</i>	XM_031105477.1	81.57	白栎 <i>Quercus lobata</i>
<i>QrGAMYB</i>	XM_050430078.1	81.43	夏栎 <i>Quercus robur</i>
<i>CaGAMYB</i>	XM_059574446.1	79.55	欧榛 <i>Corylus avellana</i>

将胡桃楸花发育相关 *JmGAMYB* 编码的蛋白质与核桃、山核桃、欧洲栎木等其他物种 *GAMYB* 编码的氨基酸序列比对(图 3),表明 *JmGAMYB* 具有 MYB 保守结构域,同时具有 R2-R3 MYB 结构域特征。



图3 JmGAMYB与其他物种的GAMYB编码的蛋白氨基酸序列比对

Figure 3 Amino acid sequence comparison of JmGAMYB with GAMYB-encoded proteins of other species

在NCBI中选取16个物种的GAMYB基因编码的氨基酸序列,使用MEGA X软件,利用最大似然法结合JmGAMYB氨基酸序列构建系统发育进化树(图4)。结果表明,胡桃楸JmGAMYB蛋白与核桃JrGAMYB亲缘关系最近,之后与美国山核桃CiGAMYB、欧榛CaGAMYB、英国栎木AgGAMYB、白栎QiGAMYB、夏栎QrGAMYB、栓皮栎(Quercus suber)QsGAMYB亲缘关系较近,被聚在一个分支上。与银鹊树(Tapiscia sinensis)TsGAMYB等9个物种的GAMYB基因亲缘关系较远,被分在不同的分支上。

2.3 miR319b-JmGAMYB的表达分析及RLM 5'RACE靶向关系验证

miRNA测序数据分析筛选出胡桃楸花发育关键Jm-miR319b基因,通过对生理分化期花芽设计颈环引物,以U6为内参,进行qRT-PCR,用于验证在雌先型和雄先型两种生殖类型的雌花芽和雄花芽中Jm-miR319b的表达情况。结果发现:Jm-miR319b基因无论在雌先型还是雄先型中,雌花芽表达量均显著高于雄花芽表达量(p<0.05);在雌先型中表达量显著高于雄先型表达量。以Actin为内参,对胡桃楸生理分化期中JmGAMYB基因的qRT-PCR分析发现JmGAMYB在两种生殖类型中雄花芽表达量均显著高于雌花芽,与Jm-miR319b趋势相反(图5)。利用RLM 5'RACE验证测序数据中预测的靶向关系,产物测序结果表明,JmGAMYB是Jm-miR319b在胡桃楸花发育过程中的直接靶基因,靶向切割位点在Jm-miR319b第10~11个碱基(图6)。

2.4 JmGAMYB基因在不同器官中的表达分析

以Actin为内参基因,对JmGAMYB基因在胡桃楸不同器官组织中的表达分析,结果表明,JmGAMYB基因在茎、叶、雌花芽、雄花芽、果实中均表达,其相对表达量在花芽组织中较高,且在雄花芽中表达量最高,之后依次为雌花芽、果实、叶和茎(图7)。因此,推测JmGAMYB基因在胡桃楸花芽发育过程

中起到了重要的调控作用。

2.5 JmGAMYB基因在不同生殖类型花芽不同发育时期的表达分析

以 Actin 基因为内参基因,对 JmGAMYB 基因在生理分化期(4月2-30日)和形态分化期(5月4-22日)中两种生殖类型雌雄花芽的表达模式进行分析,由图 8 可知,无论是生理分化期还是形态分化期,JmGAMYB 基因在雌先型和雄先型的雌、雄花芽相对表达量均呈显著差异($p < 0.05$),因此推测 JmGAMYB 对胡桃楸花发育整个过程都具有明显的调控作用,而且在花芽分化早期就已经开始起到调控作用。且随着花芽的不断发育,在形态分化期 5 月 12-16 日期间,雄先型雄花芽开始迅速发育成熟散粉,JmGAMYB 基因在雄先型雄花芽相对表达量持续增加,最终在 5 月 16 日 JmGAMYB 相对表达量达

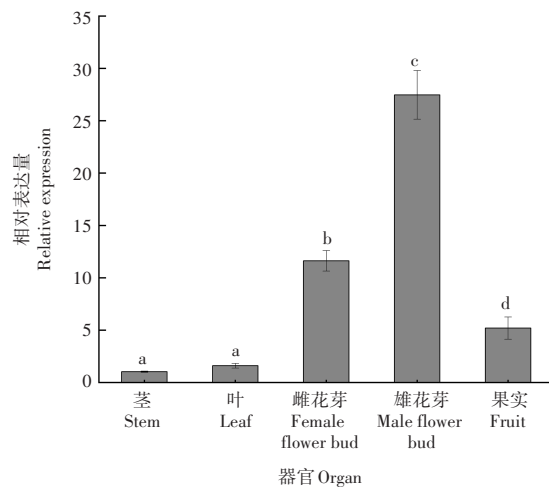
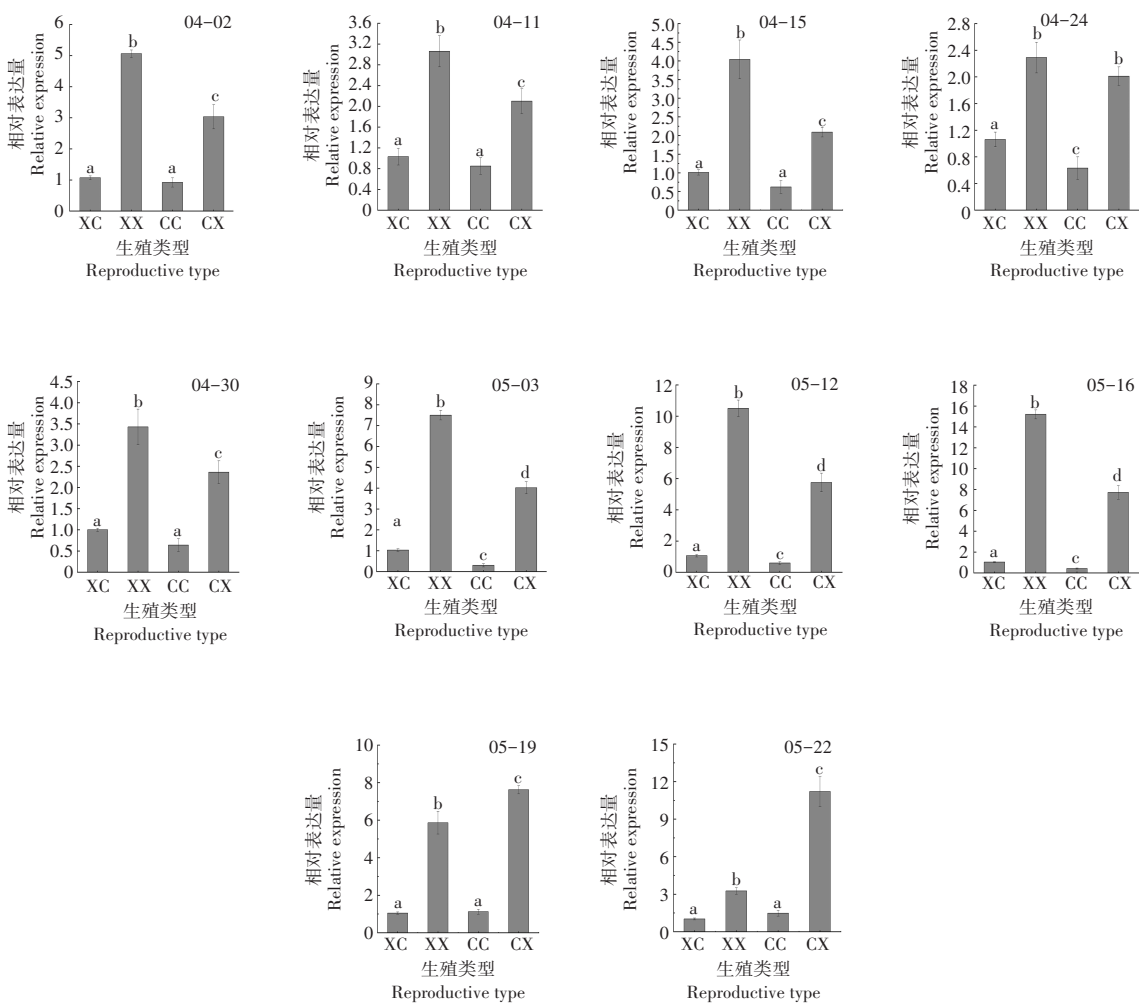


图 7 JmGAMYB基因在不同器官中的表达模式分析
Figure 7 Analysis of the expression pattern of JmGAMYB gene in different tissues



CC.雌先型雌花芽;CX.雌先型雄花芽;XC.雄先型雌花芽;CX.雄先型雄花芽

CC. Female primordial female flower bud; CX. Female prokaryotic male flower bud; XX. Androgenic male flower bud; XC. Male primordial female flower bud

图 8 JmGAMYB基因在生理分化期(4月2-30日)和形态分化期(5月3-22日)雌、雄先型中雌、雄花芽的表达

Figure 8 Expression of JmGAMYB gene in male and female flower buds during physiological (2-30 April) and morphological(3-22 May) differentiation stages

到最高。5月16-22日,雌先型雄花芽开始发育至散粉,最终在5月22日 *JmGAMYB* 基因相对表达量在雌先型雄花芽达到最高,而在散粉后雄先型雄花芽的表达量开始有所降低。这种基因表达模式交替出现高峰的现象与胡桃楸雄花芽交替散粉一致。因此,推测 *JmGAMYB* 基因在胡桃楸花发育整个过程中起到重要的调控作用,且主要与雄花芽的发育有关。

3 讨论与结论

近年来植物花发育已经逐步成为学术研究的热点,而对雌雄异型异熟植物性别分化机制的研究目前还不够深入。胡桃楸是我国北方珍贵的木本粮油经济树种,为国家二级保护植物^[33]。但由于其雌雄异型异熟的生殖特性,在有效避免自交的同时,也会导致自然条件下结实率和种子质量参差不齐。而有性繁殖是自然条件下木本植物繁衍后代的主要形式^[34],因此,对胡桃楸花芽分化及发育过程的研究可以为该物种遗传改良、良种选育奠定良好的基础。

miRNA 和其调控的靶基因表达可以显著影响植物性器官的发育与转化^[35-36]。越来越多的研究表明,miRNA 通过靶向一系列的核心转录因子,在植物生命活动中发挥着重要作用。其中 *miR319* 是植物中最保守的 miRNA 家族之一,课题组前期研究中发现 *miR319b* 是胡桃楸花发育的关键 miRNA。但对 *miR319* 的研究多数都集中于其靶向 TCP 转录因子来调节植物生命中各种活动,在本研究中通过 RLM 5' RACE 技术验证了 *Jm-miR319b* 对 *JmGAMYB* 基因有直接靶向作用。这与番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[37-38] 中的研究结果一致。赤霉素 (GA) 是对花发育具有重要调控作用的激素之一, *GAMYB* 基因家族属于 R2-R3 MYB 家族,同时也是赤霉素信号传导途径的重要正调控因子,外源施加赤霉素会显著提高 *GAMYB* 的表达量^[39]。研究表明 *GAMYB* 位于 *DELLA* 基因的下游^[40],且编码的蛋白可以响应 GA 信号且激活下游的 α -淀粉酶等基因的表达^[41]。本研究进一步鉴定出胡桃楸 *JmGAMYB* 基因有着保守重复的 MYB 结构域,表明 *JmGAMYB* 基因是 *GAMYB* 家族成员。且前期课题组对胡桃楸花发育关键基因 *JmDELLA* 基因的表达分析发现, *JmDELLA* 与 *JmGAMYB* 基因的表达模式类似,在胡桃楸各器官中均有表达,且在雄花芽高表达^[42]。 *GAMYB* 基因在花发育和花药发育中起到重要作用^[43],在大麦中也发现 *GAMYB* 在雄蕊中出现高表达的情况。在拟南芥中,也有研究表明 *GAMYB* 基因参与了花药的发育^[44]。在黄瓜中已经证明 *miR159* 和 *miR319* 可以通过调控 *GAMYB* 基因家族来调控雌雄花的比例,沉默 *GAMYB1* 会导致黄瓜中雄花和雌花的比例降低^[45]。在番茄中 *GAMYB* 可以调控糖代谢基因来控制花药的发育,干扰 *GAMYB* 家族成员 *MYB33* 会导致花粉可育性降低^[46]。在百合中发现 *GAMYB* 基因可能在花药发育的早期就已经开始起作用,并且在花药成熟体的表达水平仍较高^[47]。本研究与上述研究结果一致。因此,进一步对胡桃楸花芽的“miRNA-靶基因模块”进行研究,有利于深入了解其在胡桃楸花发育的分子调控机制,有助于人工调控花期,促进胡桃楸结实,提高产量。综上所述,本研究鉴定了 *Jm-miR319* 与 *JmGAMYB* 的靶向关系以及在花发育过程的调控机制,为进一步验证其功能奠定基础。然而,为了更全面的阐明胡桃楸 *Jm-miR319-JmGAMYB* 模块调控花发育机制,构建完善的花发育分子调控网络,仍需要更全面的后续研究。

本研究鉴定了胡桃楸 *Jm-miR319b-JmGAMYB* 模块,并对胡桃楸 *miR319b* 及其靶基因 *JmGAMYB* 进行 qRT-PCR 分析,发现在雌雄先型雌、雄花芽中表达趋势相反。对其进行靶向关系验证,发现其切割位点在 *miR319b* 成熟体第 10~11 位碱基。通过 PCR 克隆得到胡桃楸 *JmGAMYB* 基因 CDS 全长序列为 1 503 bp,编码 500 个氨基酸。Blast 同源性分析发现 *JmGAMYB* 基因与其他物种 *GAMYB* 基因同源性达到 75% 以上。qRT-PCR 表达分析发现 *JmGAMYB* 基因在茎、叶、雌雄花芽和果实等器官均有表达,但在雄花芽中表达量最高。在生理分化期(4月2-30日)和形态分化期(5月3-22日)中同一生殖类型中的雌、雄花芽表达量差异均显著,且随着两种生殖类型雄花交替开放、散粉, *JmGAMYB* 表达量也随之交替出现高峰。因此,推测 *Jm-miR319b-JmGAMYB* 模块在胡桃楸花发育过程中起到重要的调控作用,且在花芽分化早期就已经发挥作用。本研究结果将为后续对 miRNA-mRNA 介导的胡桃楸花发育基因调控网络的研究奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 张丽杰,董天一,吴静雯,等.胡桃楸成花相关基因 *JmSOC1* 克隆和表达分析[J].沈阳农业大学学报,2023,54(6):673-682.
- [2] 蔡佳友,董天一,傅靖棋,等.胡桃楸成花相关 *JmCO* 基因的克隆和表达分析[J].沈阳农业大学学报,2021,52(5):618-624.
- [3] 王东娜,牟长城,高卓,等.胡桃楸天然种群遗传多样性的 ISSR 分析[J].经济林研究,2011,29(2):22-29.
- [4] ZHANG Q H, CHEN S, QU G Z, et al. Provenance and family variations in early growth of Manchurian walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.) and selection of superior families[J]. PLoS One, 2024, 19(3): e0298918.
- [5] 王悦.胡桃楸良种选育及育苗技术研究进展[J].农业工程技术,2023,43(34):123-124.
- [6] 果冲.雌雄异型异熟胡桃楸生殖生物学的初步研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [7] ZHANG L J, FU J Q, DONG T Y, et al. Promoter cloning and activities analysis of *JmLFY*, a key gene for flowering in *Juglans mandshurica*[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1243030.
- [8] 张丽杰,果冲,秦柏婷,等.胡桃楸开花物候特性及花粉生活力[J].东北林业大学学报,2019,47(5):4-8.
- [9] 张琳宜,曹均,吴裕鹏,等.植物性别分化机制研究进展[J].山东农业科学,2023,55(7):167-172.
- [10] RENNER S S, MÜLLER N A. Sex determination and sex chromosome evolution in land plants[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2022, 377(1850): 20210210.
- [11] RIFKIN J L, HNATOVSKA S, YUAN M, et al. Recombination landscape dimorphism and sex chromosome evolution in the dioecious plant *Rumex hastatulus*[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2022, 377(1850): 20210226.
- [12] 许自龙,陈益存,高暝,等.被子植物性别分化的研究进展[J].林业科学,2019,55(8):157-169.
- [13] HUI W K, WANG Y, YAN S J, et al. Simultaneous analysis of endogenous plant growth substances during floral sex differentiation in *Jatropha curcas* L. using HPLC-ESI-MS/MS[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 241: 209-217.
- [14] ZHENG Y Q, LUO X F, WANG X, et al. The role of phytohormones and their related miRNAs in sex differentiation of *Xanthoxerces sorbifolium* Bunge[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 307: 111498.
- [15] CHEN G S, LI J T, LIU Y, et al. Roles of the GA-mediated SPL gene family and miR156 in the floral development of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(7): 1577.
- [16] 孟晓庆,侯智霞,张兰,等.GA₃和PP₃₃₃对榛子成花的影响及其作用机制[J].河南农业科学,2013,42(4):115-118.
- [17] 郝俊飞.杂种落叶松花器官发育过程及赤霉素诱导开花机理研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2023.
- [18] YANG X T, WANG K, BU Y N, et al. The transcription factor *TaGAMYB* modulates tapetum and pollen development of TGMS wheat YanZhan 4110S via the gibberellin signaling[J]. Plant Science, 2022, 324: 111447.
- [19] ZHOU F W, CHEN Y N, WU H T, et al. Genome-wide comparative analysis of R2R3 MYB gene family in *Populus* and *Salix* and identification of male flower bud development-related genes[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 721558.
- [20] ZHANG Y, ZHANG B, YANG T W, et al. The GAMBYB-like gene *SlMYB33* mediates flowering and pollen development in tomato[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 133.
- [21] ZHANG X Y, XIANG W, DONG F, et al. Overexpression of apple *MdGAMYB* promotes early flowering and increases plant height in transgenic Arabidopsis and tomato[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 328: 112880.
- [22] 王梦琦,解振强,孙欣,等.葡萄 miR159 及其靶基因 *VvGAMYB* 在花发育过程中的作用分析[J].园艺学报,2017,44(6):1061-1072.
- [23] LUO H Y, ZHANG H C, WANG H S. Advance in sex differentiation in cucumber[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1186904.
- [24] 张颜.黄瓜中GA信号转导因子 *CsGAIP* 和 *CsGAMYB1* 的克隆与功能分析[D].北京:中国农业大学,2014.
- [25] LI M X, TIAN X, MUSTAFA G, et al. Involvement of miRNAs regulation on both flower development and secondary metabolism in *Lonicera japonica* Thunb[J]. Environmental and Experimental Botany, 2024, 218: 105569.
- [26] SHEN J J, WANG X H, LI Y Y, et al. Screening of reference miRNA of different early- and late-flowering tree peony varieties[J]. Plants, 2023, 12(14): 2629.
- [27] GAO P, BAI X, YANG L, et al. Over-expression of *osa-MIR396c* decreases salt and alkali stress tolerance[J]. Planta, 2010, 231(5): 991-1001.
- [28] WAHEED S, ZENG L H. The critical role of miRNAs in regulation of flowering time and flower development[J]. Genes, 2020, 11(3): 319.

- [29] JIAN C,HAO P G,HAO C Y,et al.The miR319/TaGAMYB3 module regulates plant architecture and improves grain yield in common wheat (*Triticum aestivum*)[J].New Phytologist,2022, 235(4):1515–1530.
- [30] ZHU L,LI S S,MA Q Y,et al.The *Acer palmatum* TCP transcription factor *ApTCP2* controls leaf morphogenesis,accelerates senescence,and affects flowering via miR319 in *Arabidopsis thaliana*[J].Journal of Plant Growth Regulation,2022,41(1): 244–256.
- [31] VISENTIN I,FERIGOLO L F,RUSSO G,et al.Strigolactones promote flowering by inducing the miR319–LA–SFT module in tomato[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2024,121(19):e2316371121.
- [32] TAO J Y,PAN Z J,KONG W W,et al.miR319–TCPs–*TGA9/TGA10/ROXY2* regulatory module controls cell fate specification in early anther development in *Arabidopsis*[J].Science China Life Sciences,2024,67(4):839–842.
- [33] ZHANG S K,ZHAN W,ZHANG H,et al.Genetic improvement in *Juglans mandshurica* and its uses in China:Current status and future prospects[J].Phyton,2022,91(3):489–505.
- [34] 方瑞秋,应多,陈晓龙,等.*OsCMT3a*调控了水稻雄性生殖发育[J].分子植物育种,2023,21(13):4270–4277.
- [35] LIU B,LI G L,CHEN C J,et al.Species-specific regulatory pathways of small RNAs play sophisticated roles in flower development in *Dimocarpus longan* Lour[J].Horticultural Plant Journal,2023,9(2):237–249.
- [36] WAHEED S, ZENG L H.The critical role of miRNAs in regulation of flowering time and flower development[J].Genes, 2020,11(3):319.
- [37] SHI X P,JIANG F L,WEN J Q,et al.Overexpression of *Solanum habrochaites* microRNA319d (Sha-miR319d) confers chilling and heat stress tolerance in tomato (*S.lycopersicum*)[J].BMC Plant Biology,2019,19(1):214.
- [38] DA SILVA E M,SILVA G F F E,BIDOIA D B,et al.MicroRNA159-targeted *SIGAMYB* transcription factors are required for fruit set in tomato[J].The Plant Journal,2017,92(1):95–109.
- [39] YU S,GALVÃO V C,ZHANG Y C,et al.Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted *SQUAMOSA* promoter binding-like transcription factors[J].The Plant Cell,2012,24(8):3320–3332.
- [40] 钱双杰,吴刘清,邓雨琦,等.赤霉素关键蛋白 DELLA 对植物雄蕊发育研究进展[J].上海师范大学学报(自然科学版), 2023,52(6):736–742.
- [41] GUBLER F,KALLA R,ROBERTS J K,et al.Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells:Evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter[J].Plant Cell,1995,7(11):1879–1891.
- [42] 范新蕊,秦柏婷,蔡佳友,等.胡桃楸激素调控相关 *JmDELLA* 基因克隆与表达分析[J].分子植物育种,2024,22(9):2891–2897.
- [43] LI Q X,LI J G,ZHANG L,et al.Gibberellins are required for dimorphic flower development in *Viola philippica*[J]. Plant Science,2021,303:110749.
- [44] ALLEN R S,LI J Y,ALONSO-PERAL M M,et al.MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects[J].Silence,2010,1(1):18.
- [45] ZHANG Y,ZHANG X L,LIU B,et al.A GAMYB homologue *CsGAMYB1* regulates sex expression of cucumber via an ethylene-independent pathway[J].Journal of Experimental Botany,2014, 65(12):3201–3213.
- [46] ZHANG Y,ZHANG B,YANG T W,et al.The GAMYB-like gene *SIMYB33* mediates flowering and pollen development in tomato[J].Horticulture Research,2020,7:133.
- [47] LIU X Y,HE L,WU Z,et al.GAMYB transcription factor *LoMYB65* from lily plays a vital role in pollen development[J].Horticultural Plant Journal,2024,10(1):223–238.

[责任编辑 马迎杰]