

甘蓝型油菜角果和种子发育相关的 Bna-novel-miR432 功能分析

刘 倩, 王 鑫, 赵 云

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘 要: 为了探究 miRNA 在油菜花器官发育、角果和种子发育中的功能,本研究在甘蓝型油菜不同发育阶段角果和种子小 RNA 测序数据分析中,筛选到一个新的 miRNA,命名为 Bna-novel-miR432,并将其转化至拟南芥中进行功能分析. 研究发现过表达 Bna-novel-miR432 拟南芥开花时间显著提前,并且发现其雄蕊发育存在缺陷,导致雌蕊授粉不完全. 在对其花粉育性进行检测时发现过表达材料花粉育性显著降低. 对角果发育统计发现,过表达拟南芥株系的角果变短,角果中种子数量显著减少,且部分角果存在败育的现象. 此外,在种子发育方面,过表达材料种子中胚的发育也出现滞后的现象. 以上结果表明,Bna-novel-miR432 参与调控植物开花时间、雄蕊和花粉的发育以及果实的形成等生物学过程中发挥一定的调控功能.

关键词: 甘蓝型油菜; 拟南芥; Bna-novel-miR432; 花发育; 角果发育; 种子发育

中图分类号: Q52 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.056003

Functional analysis of Bna-novel-miR432 related to silique and seed development in *Brassica napus*

LIU Qian, WANG Xin, ZHAO Yun

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To explore the functions of miRNA in flower organ development, silique and seed development in *Brassica napus*, a novel miRNA named Bna-novel-miR432 was screened by analyzing the small RNA sequencing data of *Brassica napus* silique and seed at a different developmental stage. Then the miRNA was overexpressed in the *Arabidopsis thaliana* for functional analysis. The results showed that the flowering time of the stably transformed plants overexpressing Bna-novel-miR432 was significantly advanced, and the observation of flower development showed that there were defects in stamen development, resulting in incomplete pollination of the pistils. we further tested pollen fertility and found that the pollen fertility decreased significantly. The statistics of silique development showed that the length of silique in the overexpressed *Arabidopsis* lines was shorter, the number of seeds was significantly reduced and some of them were aborted. And the statistics on seeds development also showed that the development of the embryo was delayed. Therefore, Bna-novel-miR432 is involved in the regulation of flowering time, the development of stamens and pollen, and the development of fruit.

Keywords: *Brassica napus*; *Arabidopsis thaliana*; Bna-novel-miR432; Flower development; Silique development; Seed development

收稿日期: 2022-03-02

基金项目: 四川省科技厅重大科技专项(2022ZDZX0015)

作者简介: 刘倩(1996—), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事油菜遗传育种. E-mail: lq15202834756@163.com

通讯作者: 赵云. E-mail: zhaoyun@scu.edu.cn

1 引言

油菜作为我国第一大油料作物^[1],同时也是继水稻、玉米和小麦后被广泛种植的第四大作物,在提供人类食用油以及动物饲料之外^[2],还能作为生物燃料促进工业的发展^[3],具有极高的经济价值.所以筛选优质的油菜种质资源,提高作物产量一直是育种工作的重心.油菜和拟南芥等十字花科植物的果实称为角果,角果不仅能进行光合作用为种子提供发育所需要的能量,以及为植株其他部分的发育提供碳水化合物,还能保护种子免受各种生物与非生物胁迫^[4].因此油菜角果性状的改良对提高油菜籽粒品质和产量至关重要.

植物性状的变化是由基因决定的,而基因的表达水平在很大程度上受到多种内源因素的调控,近年来关于非编码 RNA 尤其是 MicroRNA (miRNA)参与植物基因调控的研究逐渐成为研究热点. miRNA 是一类长度在 21~24 nt 的内源单链非编码 RNA^[5],miRNA 与 Dicer 酶和 AGO(AR-GONAUTE)蛋白等结合形成 RNA 诱导转录沉默复合体(RNA-induced tRNAscriptional silencing, RISC)靶向 mRNA^[6],导致 mRNA 的降解或抑制翻译过程,调控基因表达^[7].从秀丽线虫中发现的第一个非编码 RNA lin-4 后开始^[8],越来越多 miRNA 被挖掘研究.研究表明 miRNA 在植物生长发育、非生物和生物胁迫的响应等方面具有重要作用.例如,miRNA 参与调控植物从种子萌发^[9]、营养器官的生长^[10]、花的发育到种子的成熟^[11]等各个时期的生长发育过程. miRNA 还能调控植物响应干旱胁迫、冷胁迫、重金属胁迫、热胁迫、营养胁迫和渍水胁迫等非生物胁迫^[12].此外 miRNA 还能参与调控植物响应包括病毒病害、真菌病害、细菌病害以及植原体病害等生物胁迫^[13,14].因此近年来越来越多的 miRNA 功能被验证,为其相关研究提供了更深入的思路和广泛理论依据.

目前关于 miRNA 调控十字花科植物角果和种子发育相关的研究较少,而十字花科角果发育相关 miRNA 的现有研究主要集中于角果长度及角果数量调控等方面. Chen 等^[4]通过 miR160 在油菜中的过表达发现 miR160 可通过调节生长素应答途径来调控角果的长度; Wang 等^[15]发现 miR397b 通过调控漆酶基因 *LAC4*(*LACCASE 4*)的表达,影响拟南芥角果木质素的合成和角果的数量.对 miRNA 在十字花科植物种子发育中的研

究主要集中在胚的发育、营养物质的贮藏及生长素调节等方面.如 miR167 通过调控其靶基因来影响生长素响应因子 *ARF6*(*AUXIN RESPONSE FACTOR 6*)和 *ARF8*(*AUXIN RESPON FACTOR 8*)的表达,调控种子的发育^[16].与其他作物相比,油菜 miRNA 的研究相对较少,且大部分停留在对小 RNA 测序数据中 miRNA 的挖掘、表达模式分析与功能预测等方面.因此,研究相关 miRNA 在油菜角果和种子发育中的功能,对油菜种子资源的改良具有重要意义.

本研究通过对实验室现有甘蓝型油菜不同发育时期角果和种子小 RNA 测序数据进行分析,筛选到在角果和种子发育后期(心形胚到 U 形胚时期)高表达且未见报道的 miRNA,命名为 Bna-novel-miR432.本课题组通过前期研究种子胚的发育过程发现,种子发育后期是胚中器官成熟的关键时期,直接影响种子的发育和营养物质的积累非常重要.因此将 Bna-novel-miR432 在拟南芥中稳定表达,探究其对开花时间、雄蕊和花粉发育以及角果和种子的发育等方面的调控作用,以期未来在油菜优良性状筛选过程中提供一定的遗传资源和理论依据.

2 材料与方法

2.1 种子材料

甘蓝型油菜科乐油 1 号(*Brassica napus* L.)四川科乐油菜研究开发有限公司提供;拟南芥哥伦比亚型(*Arabidopsis thaliana*, Col-0),由本实验室提供.

2.2 方法

2.2.1 RNA 的提取以及 qPT-PCR 使用 Trizol 法^[17]提取甘蓝型油菜 Z5 时期(授粉后第 15 d,心形胚)、Z6 时期(授粉后第 22 d,线性子叶胚)及 Z7 时期(授粉后第 22 d,U 形胚)、转基因株系和野生型完整角果的 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用超微量核酸分析仪(NANO-200,杭州奥盛)检测 RNA 浓度和质量.

采用 TransScript® miRNA First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(AT351-01,北京全式金)加尾反转录试剂盒反转录得到 cDNA 作为模板,以甘蓝型油菜 *BnActin7* 为内参基因(表 1),使用 TB Green®Premix Ex TaqTM II(RR420Q, TaKaRa),引物为 qPCR-miR432-F(表 1),进行油菜中 Bna-novel-miR432 表达量验证;使用 *AtU6-26* 为

内参基因(表 1),引物为 qPCR-miR432-F(表 1),检测稳定转化株系角果中 Bna-novel-miR432 表达量. 采用 TransScript® Reverse Transcriptase(AT101-02,北京全式金)反转录试剂盒反转录得到 cDNA 作为模板,引物为 qPCR-MYB106F/R(表 1),检测稳定转化植株角果中 Bna-novel-miR432 靶基因的表达量. qRT-PCR 程序均为 95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s;60 ℃ 30 s,40 个循环,设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复,相对表达量用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算^[18].

表 1 引物	
Tab. 1 Primers	
引物名称	引物序列(5'-3')
qPCR-miR432-F	ACCACAGUUGAACCGCUUGUCCCG
MIR432-F	GC <u>GAGCTC</u> TCTATAACCGTGCTACTATGAGA
MIR432-R	GCT <u>TCTAGAT</u> TGTTGCCCAATACGCTCTA
qPCR-MYB106-F	CTACTGGAACACACACTTGA
qPCR-MYB106-R	CGTTCTTTGATTGTCCTGTG
AtU6-26-F	GGGGACATCCGATAAAAT
AtU6-26-R	ATTTGGACCATTTCTCGAT
BnActin7-F	TCTTCCTCACGCTATCCTCC
BnActin7-R	AGCCGTCTCCAGCTCTTG

注:下划线处代表酶切位点序列

2.2.2 Bna-novel-miR432 前体的克隆和过表达载体构建 在 NCBI 数据库中对 Bna-novel-miR432 前体序列进行 Blast 比对,对前体序列以及上下游 0.4~0.6 kb 侧翼序列进行克隆,克隆引物 MIR432-F/R(表 1),在引物中加入酶切位点 Sac I 和 Xba I,引物由上海生工生物工程公司合成. PCR 反应程序:98 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 5 min. 利用 EasyPure® PCR Purification Kit 产物回收试剂盒(EP101-01,北京全式金)纯化回收目的片段,与 pCambia1300s 质粒连接并转化至大肠杆菌 DH5α(T-TSC-C14,北京擎科),挑取单菌落进行 PCR 和测序鉴定,构建成功的 pCambia1300s-Bna-novel-miR432 融合过表达图谱如图 1 所示.

2.2.3 拟南芥的培养及遗传转化 将拟南芥的种子经 75%酒精和 1%次氯酸钠消毒,放入 4 ℃ 冰箱春化 3 d 后均匀点在 MS 固体培养基上,放入光照培养箱垂直培养 7~10 d 后,移栽长势均匀幼苗到土壤中,覆膜 3 d 后在拟南芥培养室中进行长日照条件下培养(光周期为光照/黑暗=16 h/8 h,温度为 24 ℃).

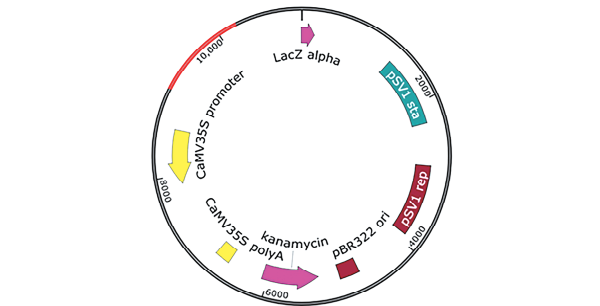


图 1 pCambia1300s-Bna-novel-miR432 融合过表达图谱
Fig. 1 The plasmid profile of pCambia1300s-Bna-novel-miR432

通过花序浸染的方法^[19]进行拟南芥遗传转化. 具体步骤为:首先将 pCambia1300s-Bna-novel-miR432 重组质粒转入农杆菌中,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,鉴定正确农杆菌进行扩大培养 12~16 h 后离心,用重悬液重悬沉淀并稀释至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.2;剪去授粉完毕的花朵及果荚;将花序完全浸入浸染液中 30 s 后,避光培养 24 h 后光照下正常培养,每隔 5 d 重复上述浸染步骤,重复浸染 2 次;待其种子成熟后收取 T₀ 的代种子. 将 T₀ 代的种子通过含有 25 mg/mL 潮霉素的 MS 平板进行抗性筛选,将抗性苗移栽土培,待其长到 6 叶期时,PCR 对抗性苗进行转基因阳性鉴定,将转基因阳性苗进行单株自交收种,使用该方法连续筛选三代后得到纯合的稳定转化植株.

2.2.4 拟南芥中 Bna-novel-miR432 靶基因的预测 使用在线软件 psRNATarget (<http://plant-grn.noble.org/psRNATarget/>)进行 Bna-novel-miR432 在拟南芥中靶基因的预测,期望值(E 值)小于等于 3 的结果作为 miRNA 可能的靶基因.

2.2.5 拟南芥生育期及花形态结构观察 拟南芥培养方法参照 2.2.3,幼苗移栽土壤 2 w 后,每隔 2 d 对转基因拟南芥和野生型拟南芥开花情况进行观察,并统计拟南芥主花序约 1~2 cm 时莲座叶数目. 取开花前一天的花蕾,在体式显微镜(SMZ18, Nikon)下进行解剖观察并拍照.

2.2.6 拟南芥花粉活性检测 (1)亚历山大染色:取开花前一天的花蕾,用解剖针和镊子轻轻将花瓣剥开,将花药取出放在载玻片上,滴上 1~2 滴亚历山大染色液(No. G3050,北京索莱宝)染色 30 min,用正置相差显微镜(NI-U, Nikon)观察并拍照^[20]. 其中可育花粉呈红色,败育花粉呈绿色.

(2) TTC 法:取开花前一天的花蕾,取出花药,将花药置于载玻片上,滴 1~2 滴 ddH₂O,用镊子和

解剖针将花药捣碎,使里面的花粉粒充分释放出来,再滴上 1~2 滴 0.5% TTC 溶液(A610558-0005,上海生工),盖上盖破片,放入 35 ℃ 恒温培养箱静置 15 min,然后在正置相差显微镜下观察统计染色情况。

2.2.7 拟南芥角果和种子发育的表型鉴定 利用角果和种子整体透明的方法^[21],进行单角果内种子发育情况和胚发育情况的观察与统计等表型鉴定。分别取开花后第 3~12 d 的角果,每个株系取 3 株,每株随机取 20 个角果混匀,放入 12 孔板中,做好标记,样品中各加入 1 mL 固定剂(乙醇:冰醋酸=3:1),在脱色摇床上慢摇固定 10~14 h 后,用 ddH₂O 清洗 3 次,每次约 5 min,然后加入 1 mL 透明剂^[22],在脱色摇床上慢摇透明 3~5 d,期间更换 2~3 次透明液。将各时期的角果固定在载破片上,在体式显微镜下用镊子和解剖针沿着角果中间剖开,取出种子,在正置相差显微镜下统计各时期种子的胚所处时期后拍照;在体式显微镜下观察各个时期角果的发育情况,并统计单角果中的种子数量后拍照。利用 Image J 软件测量角果的宽度和长度及种子的大小,分析角果和种子发育情况。

2.2.8 数据处理 本实验中所有的数据统计均是通过 Image J(v1.8.0)、Image Lab 和 microsoft office Excel 2013 完成,作图由 origin 2017 软件完成,显著性分析采用单因素 ANOVA 分析、最小显著性差异法(LSD)多重比较, $P<0.05$ 作为显著性阈值,显著性分析均由 SPSS 25.0 完成。

3 结果与分析

3.1 Bna-novel-miR432 序列分析及靶基因预测

基于实验室已有小 RNA 测序数据分析(NCBI Sequence Read Archive (SRA)数据库,版号为

PRJNA766319),筛选得到在甘蓝型油菜角果和种子发育中上调表达有关键作用的未知 miRNA,命名为 Bna-novel-miR432,如表 2 所示。利用 UNAFold(<http://www.unafold.org/>)网址预测其前体的二级结构,发现 Bna-novel-miR432 前体序列具有茎-环结构如图 2 所示。

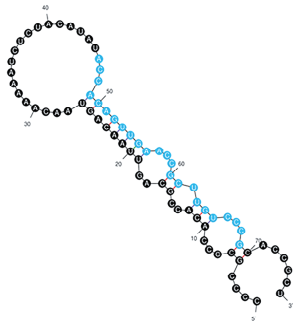


图 2 Bna-novel-miR432 二级结构
蓝色部分代表 Bna-novel-miR432 序列
Fig. 2 Secondary structure of Bna-novel-miR432
The blue part represents the Bna-novel-miR432 sequence

对 Bna-novel-miR432 在拟南芥中靶基因的预测,并结合 miRNA 的功能进行筛选。发现 Bna-novel-miR432 一个潜在靶基因 MYB106,MYB106 的剪切位点发生在与 Bna-novel-miR432 碱基配对的区域的第 11~12 位碱基之间,这一剪切位点在 MYB106 基因的内含子区域(第 1454~1477 个碱基),据此推测 Bna-novel-miR432 通过剪切 MYB106 的转录中间产物,抑制 MYB106 的初级转录产物加工为成熟 mRNA。且 AtMYB106 在油菜中有 4 个同源基因分别为 XM_013784871.2-BnMYB106, XM_013794273.2-BnMYB106, XM_013845778.2-BnMYB106 和 XM_013870914.2-BnMYB106(版本号-BnMYB106),它们具有相似的结构域,均包含两个 DNA 结合域 HTH myb-type 1 和 HTH myb-type 2(图 3)。

表 2 miRNA 的序列信息

Tab. 2 Serial information of miRNA

序列名称	miRNA 序列(5'-3')
Bna-novel-miR432 序列	ACCACAGUUGAACCGCUUGUCCCG
Bna-novel-miR432 前体序列	CCCCGCCCCACACCGCAGUUAACAGUAAACAAAAUCUCUACAUAUACCACAGUUGAACCGCUUGUCCCGCACCGCU

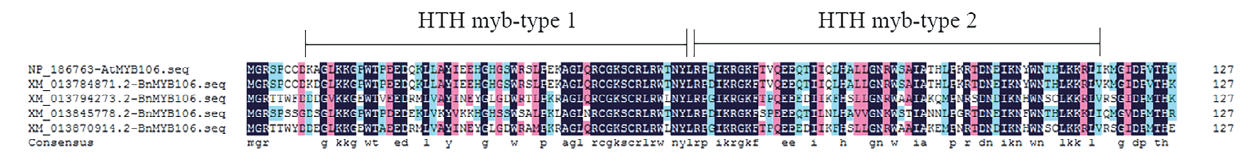


图 3 氨基酸序列对比情况
Fig. 3 Alignment of amino acid sequence

3.2 Bna-novel-miR432 在甘蓝型油菜中的表达验证

甘蓝型油菜 Z5 时期(心形胚)、Z6 时期(线性子叶胚)和 Z7 时期(U 形胚)是胚中器官成熟的关键时期,对种子的发育和营养物质的积累非常重要(图 4). 通过 qPT-PCR 检测 Bna-novel-miR432 在 Z5、Z6、Z7 时期的表达情况,结果如图 5b 所示, Bna-novel-miR432 的表达量呈上升趋势,与 Z5 时期的表达量相比,Z6 时期表达量上升 50 倍左右, Z7 时期上升 170 倍左右,其中 Z6 到 Z7 时期 Bna-novel-miR432 表达量显著上升,该表达趋势与实验室小 RNA 测序数据分析得到 Bna-novel-miR432 在 Z5、Z6、Z7 时期表达趋势(图 5a)基本一致. 表明筛选得到的 Bna-novel-miR432 在油菜发育过程中发挥了重要作用.

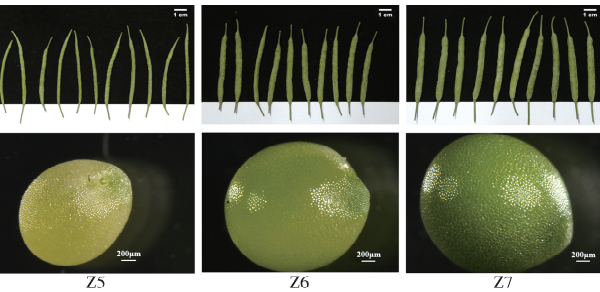


图 4 油菜角果和种子 Z5、Z6 和 Z7 时期示意图
Z5 时期(授粉后第 15 d,细小角果,胚处于心形胚时期),Z6 时期(授粉后第 22 d,角果长度宽度明显增加,胚处于线性子叶胚时期),Z7 时期(授粉后第 29 d,胚处于 U 形胚时期)
Fig. 4 Diagram of Z5、Z6 and Z7 for silique and seed in *Brassica napus*

Z5 stage (the 15th day after pollination, small siliques, embryos in the heart-shaped embryo stage), Z6 stage (the 22nd day after pollination, the length and width of the siliques increased significantly, and the embryos were in the linear cotyledon embryo stage), Z7 stage (the 29th day after pollination, the embryo is in the U-shaped embryo stage)

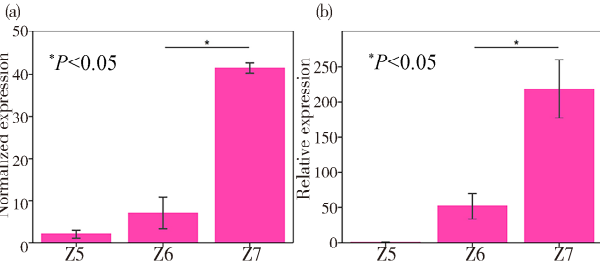


图 5 油菜角果和种子中 Bna-novel-miR432 在各时期表达情况
(a) 代表 Bna-novel-miR432 在各时期的测序表达情况;(b) 代表 Bna-novel-miR432 在各时期 qRT-PCR 检测结果
Fig. 5 Expression analysis of Bna-novel-miR432 in siliques and seeds at different stages
(a) represents the sequencing expression of Bna-novel-miR432 at different stages; (b) represents the qRT-PCR detection results of Bna-novel-miR432 at different stages

3.3 Bna-novel-miR432 拟南芥稳定转化植株的获得

通过拟南芥花序浸染的方法获得转基因植株,收取种子进行潮霉素平板抗性筛选获得 9 株阳性转化苗,经过连续三代的单株自交收种抗性筛选和利用特异性引物 MIR432-F/R(表 1)进行 PCR 鉴定,部分结果如图 6 所示. 最终获得 3 个稳定转化株系,分别命名为 MIR432OE3、MIR432OE11 和 MIR432OE20.

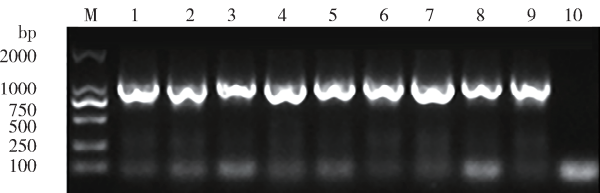


图 6 转基因拟南芥阳性苗鉴定
M 为 DL 2000 的 Marker; 1~9 分别代表阳性转基因苗;10 代表野生型拟南芥
Fig. 6 Positive identification of transgenic *Arabidopsis thaliana*
M is the Marker of DL 2000; lanes 1-9 represent positive transgenic seedlings; lane 10 represents Col-0

3.4 转基因拟南芥中 Bna-novel-miR432 及其靶基因 MYB106 的表达

Bna-novel-miR432 可能通过 miRNA 转录后调控机制负调控其靶基因的表达来实现功能,利用 qRT-PCR 的方法对转基因拟南芥中 Bna-novel-miR432 及靶基因 MYB106 的表达量进行分析. 如图 7a 所示,Bna-novel-miR432 过表达株系的角果和种子中 Bna-novel-miR432 的表达量明显较野生型植株高,其中 MIR432OE3、MIR432OE20 和 MIR432OE11 表达量分别是野生型的 35. 70 倍、5. 87 倍和 212. 52 倍. 如图 7b 所示,与野生型相比,Bna-novel-miR432 过表达株系的角果和种子中靶基因 MYB106 的表达量是显著降低的, MIR432OE3、MIR432OE11、MIR432OE20 株系中 MYB106 表达量分别为野生型中 MYB106 表达量的 26. 5%、34. 0%和 22. 6%. 由上述结果可知转基因植株中,Bna-novel-miR432 的表达趋势与其靶基因 MYB106 的表达趋势相反,证明 Bna-novel-miR432 成功表达,且调控其靶基因的表达.

3.5 Bna-novel-miR432 过表达株系长势及生育期观察

在抽薹前,过表达株系和野生型植株长势无明显差异;继续观察,拟南芥生长 21 d 后,Bna-novel-miR432 过表达株系已经抽薹,进入生殖生长阶

段,而野生型尚未抽薹仍处于营养生长阶段(如图 8 所示);当各株系主花序约 1~2 cm 时,统计拟南芥莲座叶数目(各株系均 20 株),野生型莲座叶平

均数为 8.32,Bna-novel-miR432 过表达株系莲座叶平均数为 7.38~7.37(如图 9 所示). 上述结果表明过表达株系与野生型相比开花时间显著提前.

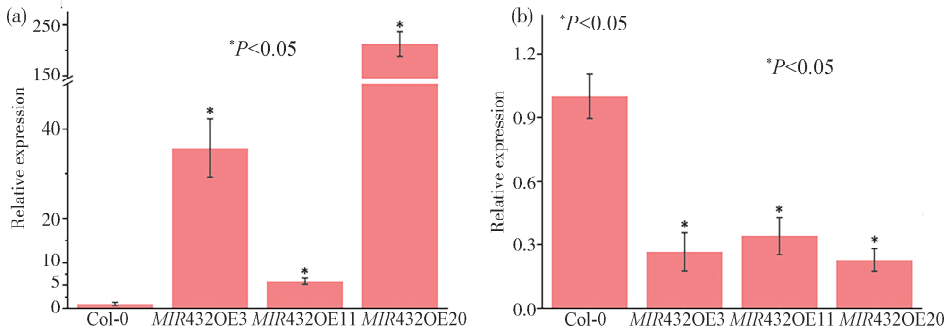


图 7 转基因拟南芥中 Bna-novel-miR432 及其靶基因 MYB106 的 qRT-PCR 检测结果
(a) 代表转基因拟南芥中 Bna-novel-miR432 的 qRT-PCR 检测结果;(b) 代表转基因拟南芥中 MYB106 的 qRT-PCR 检测结果
Fig. 7 Detection results of Bna-novel-miR432 and its target gene MYB106 in transgenic *Arabidopsis thaliana* by qRT-PCR
(a) represents the qRT-PCR detection result of Bna-novel-miR432 in transgenic *Arabidopsis*; (b) represents the qRT-PCR detection result of MYB106 in transgenic *Arabidopsis*



图 8 各株系生育期观察(21 d)
Fig. 8 Growth process of transgenic plants(21 day)

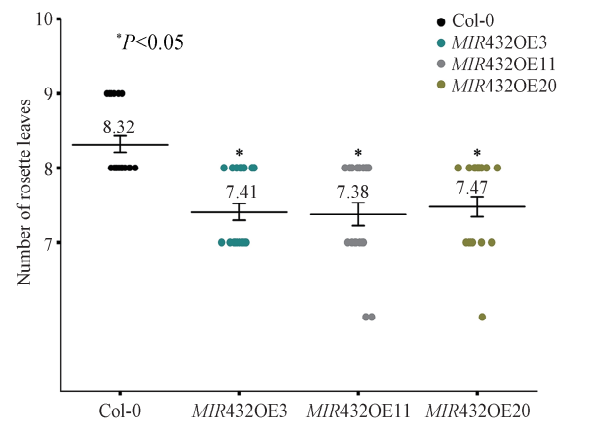


图 9 拟南芥莲座叶数目
Fig. 9 The number of rosette leaves

3.6 Bna-novel-miR432 过表达株系花结构变异

通过对花结构的显微观察发现,与野生型相比,转基因株系雌蕊、花瓣发育正常,但雄蕊花丝发育异常(如图 10 所示). 在拟南芥开花前一天的花蕾中,野生型的花丝较长,花药高于柱头且已成熟,有大量花粉释放出来,可以观察到雌蕊柱头表面附着较多花粉,但 Bna-novel-miR432 过表达株系的雄蕊略低于雌蕊柱头,使得雌蕊柱头表面仅附着有少量花粉,较多花粉附着于柱头下方,导致雌蕊授粉不完全,可能会影响到后期角果的发育.

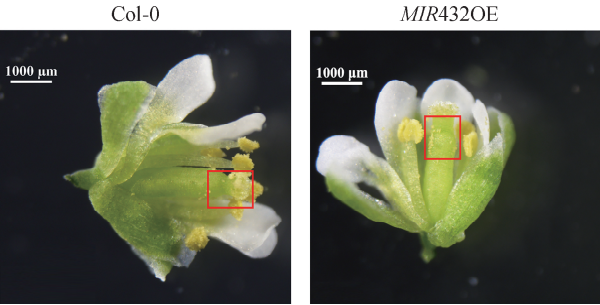


图 10 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系花结构图
Fig. 10 Flower structure of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines

3.7 Bna-novel-miR432 过表达株系花粉活性检测

利用亚历山大染色法检测花粉活力,结果如图 11 所示,与野生型相比 Bna-novel-miR432 过表达株系花药内花粉少部分染成红色,大部分呈绿色. 进一步用 TTC 法对花粉活性进行测定(如表 3 所示),与野生型相比 Bna-novel-miR432 过表达株系的花粉活力降低,其中 MIR432OE20 株系花粉活力最差.

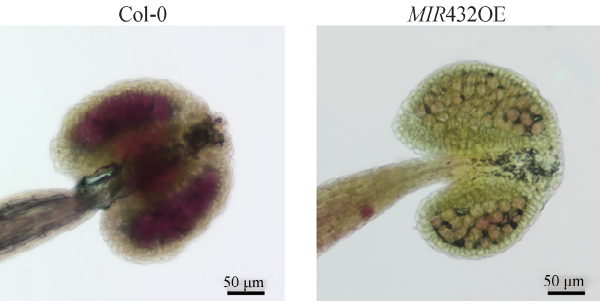


图 11 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系(MIR432OE)花药亚历山大染色
红色表示花粉可育,绿色表示花粉败育
Fig. 11 Alexander staining of stamens of and Bna-novel-miR432 overexpressed lines(MIR432OE)
Red means pollen fertile, green means pollen abortion

表 3 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系花粉活力统计表

Tab. 3 Statistics on the results of pollen vitality of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines

Material	Active pollen grain	Inactive pollen grain	pollen activity (±SE)
Col-0	160	23	0. 8985±0. 01212
	155	15	
	166	16	
MIR432OE3	128	30	0. 7553±0. 00774
	146	25	
	152	29	
MIR432OE11	156	32	0. 76433±0. 00729
	160	25	
	150	29	
MIR432OE20	160	24	0. 7441±0. 01201
	145	25	
	149	28	

3. 8 Bna-novel-miR432 过表达株系种子及胚发育情况

拟南芥种子发育情况如图 12 所示,野生型种子在开花后第 4~5 d 发育最快,种子大小达到峰值;MIR432OE3、MIR432OE11 株系种子在开花后第 5~6 d 发育最快,种子大小达到峰值, MIR432OE20 株系在开花后第 6~8 d 发育最快,种子大小达到峰值,所以 Bna-novel-miR432 过表达株系种子发育延迟. 进一步对不同时期胚的发育情况统计分析,结果如表 4 所示,开花后前 5 d 各株系胚的发育情况基本一致,从第 6 d 开始 Bna-novel-miR432 过表达株系的胚处于弯曲子叶胚时期的比例小于野生型,且在开花后第 8 d 野生型的胚均处于成熟胚时期, Bna-novel-miR432 过表达株系胚还有部分尚处于 U 形胚时期,发育至 12 d 时才完全处于成熟胚时期. 综合上述结果, Bna-novel-miR432 过表达株系胚发育延迟即种子发育延迟.

表 4 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系各时期胚发育情况统计

Tab. 4 Statistics of embryo development at different stage of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines

材料	DAF	球形胚	心形胚	鱼雷胚	线性子叶胚	弯曲子叶胚	U 型胚	成熟胚
Col-0	3	0. 3623(100)	0. 6377(176)					
	4	0. 2653(78)	0. 7347(216)					
	5		0. 0563(16)	0. 5070(144)	0. 4366(124)			
	6			0. 0488(12)	0. 2439(60)	0. 7073(174)		
	7					0. 1102(28)	0. 8110(206)	0. 0787(20)
	8							1. 0000(200)
	12							1. 0000(200)
MIR432OE3	3	0. 3773(103)	0. 6227(170)					
	4	0. 2695(69)	0. 7305(187)					
	5		0. 0458(12)	0. 5725(150)	0. 3817(100)			
	6			0. 0340(10)	0. 3367(99)	0. 6293(185)		
	7					0. 1923(50)	0. 8077(210)	
	8						0. 2051(64)	0. 7949(248)
	12							1. 0000(200)
MIR432OE11	3	0. 3825(96)	0. 6175(155)					
	4	0. 2749(94)	0. 7251(248)					
	5		0. 0675(22)	0. 5828(190)	0. 3497(114)			
	6			0. 0707(22)	0. 2765(86)	0. 6527(203)		
	7					0. 2027(60)	0. 7973(236)	
	8						0. 1977(52)	0. 8023(211)
	12							1. 0000(200)
MIR432OE20	3	0. 3692(79)	0. 6308(135)					
	4	0. 2862(85)	0. 7138(212)					
	5		0. 0692(20)	0. 6055(175)	0. 3253(94)			
	6			0. 0245(8)	0. 3374(110)	0. 6380(208)		
	7					0. 2008(49)	0. 7992(195)	
	8						0. 2121(56)	0. 7879(208)
	12							1. 0000(200)

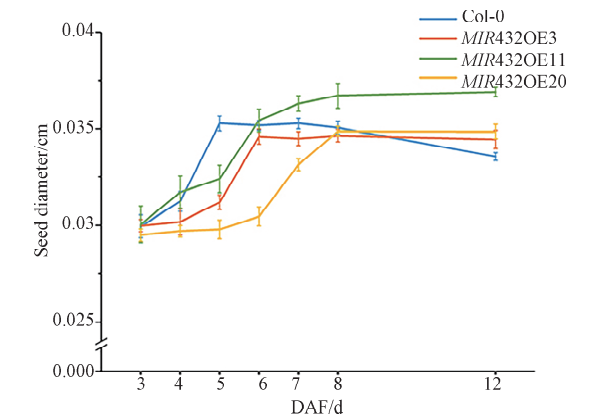


图 12 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系种子发育情况统计
DAF 表示开花后的天数
Fig. 12 Statistics of seeds development of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines
DAF represents Day after flowering

3.9 Bna-novel-miR432 过表达株系角果发育及籽粒数

不同时期拟南芥角果的宽度统计如图 13a 所示,野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系角果宽度无明显差异,且角果宽度的生长趋势基本一

致,在开花后第 4~5 d 角果宽度增长最快,在开花后第 7~8 d 角果宽度达到峰值且趋于稳定. 角果长度统计如图 13b 所示,与野生型相比, Bna-novel-miR432 过表达株系的角果长度明显变短,但生长趋势基本一致,在开花后第 3~5 d 角果长度增长速度最快,在开花后第 5~7 d 角果长度达到峰值且趋于稳定. 所以 Bna-novel-miR432 过表达株系与野生型角果生长趋势一致,但角果长度变短.

角果内种子数量和败育情况如图 14 所示. 与野生型相比, Bna-novel-miR432 过表达株系种子数目显著减少,且部分角果存在败育现象. 对各株系角果内正常种子和败育种子数进行统计分析(如图 15 所示),野生型单角果中种子总数在 42~47 粒,败育种子数在 1~2 粒; Bna-novel-miR432 过表达株系单角果中种子总数在 31~35 粒,败育种子数在 2~7 粒. 因此 Bna-novel-miR432 过表达株系的败育情况比野生型严重,且单角果内种子数显著低于野生型.

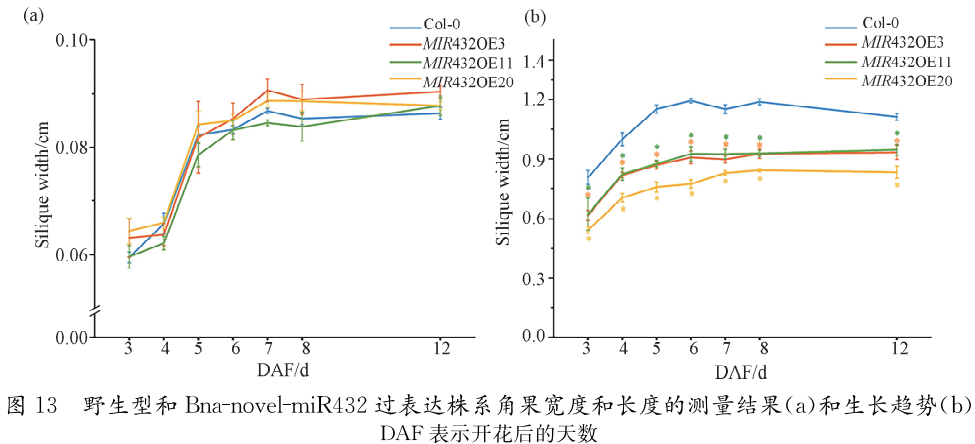


图 13 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系角果宽度和长度的测量结果(a)和生长趋势(b)
DAF 表示开花后的天数
Fig. 13 Measurement results and growth trend of silique width (a) and length of (b) Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines
DAF represents Day after flowering

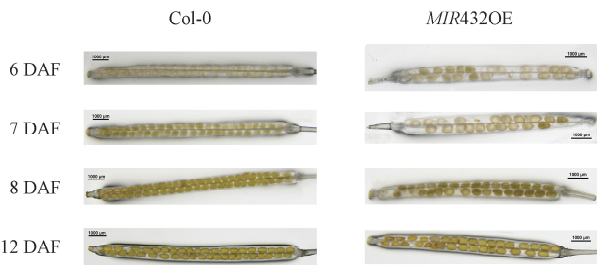


图 14 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系角果中种子数量和角果败育情况
DAF 表示开花后的天数
Fig. 14 Number of seeds and abortion of silique of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines
DAF represents Day after flowering

4 讨 论

十字花科植物角果和种子的发育情况对植物果实产量和品质影响极大,因此改良角果性状对提高种质至关重要. 本研究从实验室已有不同发育阶段甘蓝型油菜角果和种子的小 RNA 测序数据进行分析,筛选到一个未见报道的 miRNA,命名为 Bna-novel-miR432,以拟南芥作为载体初步探究了该 miRNA 的功能,为未来培育出高产、优质的油菜品系提供理论支持. 小 RNA 测序结果显示该 miRNA 与油菜角果和种子的发育关联密切,同时

预测了 Bna-novel-miR432 在拟南芥中的靶基因为 MYB106. MYB106 在调节植物毛状体分枝形成、以及开花时间的调控等过程中发挥着重要作用^[23]. 且 miRNA 一般通过负调控靶基因的表达实现其功能. 这为我们探究 Bna-novel-miR432 在拟南芥中的功能提供了参考.

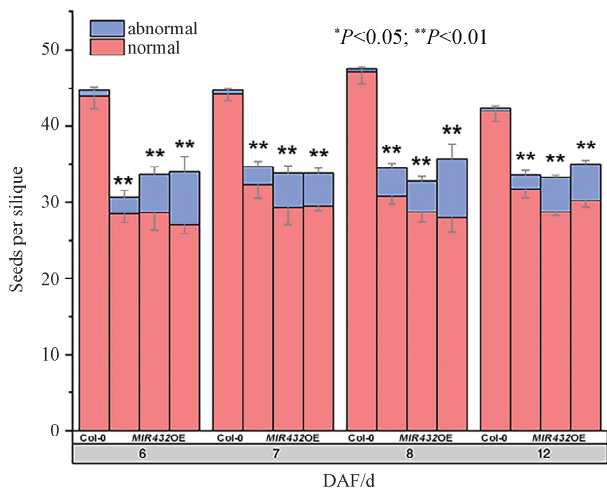


图 15 野生型和 Bna-novel-miR432 过表达株系单角果中正常种子数和败育种子数

DAF 表示开花后的天数

Fig. 15 Number of normal seeds and abnormal seeds of silique of Col-0 and Bna-novel-miR432 overexpressed lines

DAF represents Day after flowering

本研究从拟南芥过表达株系的生长过程研究发现:过表达 Bna-novel-miR432 拟南芥开花时间显著提前,并且观察发现雄蕊发育存在缺陷,导致雌蕊授粉不完全. 在对花粉育性进行检测时发现 Bna-novel-miR432 过表达株系花粉育性显著降低. 对角果发育统计发现,过表达拟南芥株系的角果长度变短,单角果中种子数量显著减少,且部分角果存在败育的现象. 此外,在种子发育方面,过表达株系种子中胚的发育也出现滞后的现象.

现有研究表明, *FT* (*FLOWERING LOCUST*) 在植物开花调控网络中起着重要作用^[24], *MYB106* 能负调控 *FT* 基因的表达,实现对植物开花时间的调控^[25]. Bna-novel-miR432 过表达株系开花时间明显提前,推断可能是过表达 Bna-novel-miR432 使其靶基因 *MYB106* 的表达降低, *MYB106* 负调控 *FT* 的表达,从而导致开花时间的提前. *MYB* 转录因子在调控绒毡层发育、花粉细胞壁的形成等花药和花粉发育中发挥着重要作用^[26]. 对与 *AtMYB106* 基因高度同源的水稻 *OsMYB106* 研究发现, *OsMYB106RNAi* 植株出现花

粉败育情况,推测 *OsMYB106* 可能通过对花粉发育相关基因进行调控,从而影响花粉细胞壁的形成进而影响花粉育性^[27]. 我们对 Bna-novel-miR432 过表达株系花粉育性检测发现, Bna-novel-miR432 过表达株系的花粉育性降低,可能是由于 Bna-novel-miR432 的过表达使其靶基因 *MYB106* 的表达量降低,进而影响与花粉形成相关基因的表达,从而造成花粉育性降低. 花粉育性与角果的发育有直接的关系,因此我们对角果的发育情况进行了观察,发现 Bna-novel-miR432 过表达株系的角果出现败育的情况,与本研究的推测相一致. 此外,我们还发现 Bna-novel-miR432 过表达株系角果长度变短,种子发育延迟等现象.

综上所述,本研究认为 Bna-novel-miR432 在植物开花时间调控、雄蕊和花粉的发育以及果实的发育过程中具有重要作用,为未来油菜种质资源的改良提供了理论依据.

参考文献:

- [1] 石柳柳. 甘蓝型油菜角果长和粒重主效 *QTL qSL-WA9* 的克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [2] 唐佳佳, 万云宝, 王茂林. 甘蓝型油菜 *Bn-bHLH122* 基因的克隆、表达模式及胁迫响应分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 026001.
- [3] 宋歌. *BnaA08. SPATULA* 和 *BnaA02. NIP6;1a* 调控甘蓝型油菜角果生长和发育的分子机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [4] Chen L, Chen L, Zhang X, *et al.* Identification of miRNAs that regulate silique development in *Brassica napus* [J]. Plant Sci, 2018, 269: 106.
- [5] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs [J]. Cell, 2009, 136: 669.
- [6] Mao Y, Xue X, Chen X. Are small RNAs a big help to plants? [J]. Sci China C: Life Sci, 2009, 52: 212.
- [7] Sunkar R, Li Y F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses [J]. Trends Plant Sci, 2012, 17: 196.
- [8] Borges F, Martienssen R A. The expanding world of small RNAs in plants [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16: 727.
- [9] 许佳. 拟南芥 miR393 通过与 ABA 信号途径调控种子成熟和萌发的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

- [10] Rubio-Somoza I, Zhou C M, Confraria A, *et al.* Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes [J]. *Curr Biol*, 2014, 24: 2714.
- [11] Nag A, King S, Jack T. miR319a targeting of *TCP4* is critical for petal growth and development in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22534.
- [12] Fujii H, Chiou T J, Lin S I, *et al.* A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2005, 15: 2038.
- [13] Zhou Y, Xu Z, Duan C, *et al.* Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to Rice black-streaked dwarf virus in maize [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67: 4593.
- [14] Carginale V, Maria G, Capasso C, *et al.* Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display [J]. *Gene*, 2004, 332: 29.
- [15] Wang C Y, Zhang S, Yu Y, *et al.* MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 1132.
- [16] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction [J]. *Development*, 2006, 133: 4211.
- [17] 孙宇哲. 拟南芥 *MIR393* 家族及靶基因在叶发育中的功能初探[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [18] Yamaguchi N, Yamaguchi A, Abe M, *et al.* *LEAFY* controls *Arabidopsis* pedicel length and orientation by affecting adaxial-abaxial cell fate [J]. *Plant J*, 2012, 69: 844.
- [19] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16: 735.
- [20] Peterson R, Slovin J P, Chen C. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains [J]. *Int J Plant Biol*, 2010, 1: 66.
- [21] 吴晓东, 杨世杰. 拟南芥胚发育的整体透明观察[J]. *农业生物技术学报*, 1997, 5: 3.
- [22] Berleth T, Jürgens G. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo [J]. *Development*, 1992, 118: 575.
- [23] Huang D, Koh C, Feurtado J A, *et al.* MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 140.
- [24] Corbesier L, Vincent C, Jang S, *et al.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 316: 1030.
- [25] Hong L, Niu F, Lin Y, *et al.* *MYB106* is a negative regulator and a substrate for CRL3(BPM) E3 ligase in regulating flowering time in *Arabidopsis thaliana* [J]. *JIPB*, 2021, 63: 1104.
- [26] McCormick S. Control of male gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: S142.
- [27] 陈利维, 王春台, 余光辉, 等. 一个水稻 *MYB* 基因的功能初步分析[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33: 6.

引用本文格式:

中文: 刘倩, 王鑫, 赵云. 甘蓝型油菜角果和种子发育相关的 Bna-novel-miR432 功能分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2022, 59: 056003.

英文: Liu Q, Wang X, Zhao Y. Functional analysis of Bna-novel-miR432 related to silique and seed development in *Brassica napus* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2022, 59: 056003.