

桃果实中miR393b靶向生长素受体基因*TIR1*的作用机制分析

张彦苹^{1,2,*}, 刘照坤³, 朱旭东⁴, 王晨⁴, 李庆魁¹

¹苏州农业职业技术学院, 江苏苏州215008

²苏州科技大学, 江苏苏州215009

³苏州市蔬菜研究所, 江苏苏州215000

⁴南京农业大学园艺学院, 南京210095

摘要: 本研究以水蜜桃品种‘小白凤’为试材, 利用miR-RACE技术验证了桃miR393b的精确序列, 克隆得到了其靶基因生长素受体*PpTIR1*的ORF序列。利用RLM-RACE技术以及qRT-PCR方法对Ppe-miR393b作用于靶基因*PpTIR1*的作用模式及作用频度进行了分析。结果表明, Ppe-miR393b的精确序列与预测序列在5'端存在1个碱基的差异, 其靶基因*PpTIR1*编码584个氨基酸且N端含有1个高度保守的F-box DNA结合域。RLM-5' RACE结果显示, Ppe-miR393b以裂解的方式作用于其靶基因*PpTIR1*, 且在Ppe-miR393b 5'端的第10和11位碱基之间以及第8和9位碱基间均存在裂解位点, 但前者的裂解频度显著高于后者。以上结果表明Ppe-miR393b通过介导靶基因*PpTIR1*的裂解参与生长素信号途径。

关键词: 桃; miR393b; *TIR1*

MicroRNA (miRNA)是一类内源非编码小RNA分子, 长度为19~24个核苷酸, 在植物和动物的转录和转录后水平调节靶基因的表达。目前的研究表明, miRNA在植物发育的多个方面起着重要调节作用, 包括植物的生长发育、对生物和非生物胁迫的响应以及植物信号转导等方面。其中, 在植物激素信号转导途径中, 研究发现许多生长素相关表型出现在miRNA-靶基因互作体系中, 说明miRNA直接或者间接的参与了植物生长素信号通路的调控, 在生长素相关通路中起到关键的调控作用(曹慧颖等2013)。

在生长素信号中, 信号转导开始时, 生长素被*TIR1* (transport inhibitor response 1)、*AFB1* (auxin signaling F-box)、*AFB2*、*AFB3*即F-box蛋白生长素受体所感应, 随后F-box蛋白与Skp1和Cullin蛋白相互作用形成E3泛素连接酶复合体, 即SCF^{*TIR1/AFB*}蛋白复合体, 调控Aux/IAA蛋白的降解, 使得Aux/IAA与ARF结合体抑制的基因开始转录, 调节植物的生长发育(Dharmasiri和Estelle 2004; Dharmasiri等2005a, b)。目前研究发现生长素信号转导组分中的*TIR1/AFBs*生长素受体蛋白能够被相关的miRNA所调控。如拟南芥中, miR393靶向*TIR1*、*AFB1*、*AFB2*、*AFB3*所编码的F-box蛋白(Jones-Rhoades和Bartel 2004), 在植物生长素信号转导过程中起着重要的调控作用。Chen等(2011)研究发现, 在拟南芥中, 外源IAA处理会导致miR393的积累量增加,

过表达*TIR1*可对拟南芥的发育产生多种效应, 包括抑制初生根的生长、侧根数量增加、叶片表型改变以及开花延迟等现象。Navarro等(2006)报道, 拟南芥中过量表达miR393抑制生长素信号, 明显提高植株对细菌侵染的抗性。同时, 超表达miR393降低拟南芥根对外源生长素的敏感性(Parry等2009)。水稻中, 过表达miR393导致靶基因*TIR1*和*AFB2*的表达水平下调, 出现水稻主根和根冠增长、分蘖多、提前开花、耐盐性和抗旱性降低等表型(Bian等2012; Xia等2012)。番茄中miR393通过调控生长素受体同源基因, 影响番茄中的生长素信号途径(林冬波2012)。Vidal等(2010)报道了硝酸盐诱导的miR393/*AFB3*的相互作用对拟南芥根系结构的调控作用。以上研究表明, miR393调控生长素受体在植物的生长发育中发挥着重要的作用。

目前植物中有关miR393参与生长素信号通路调控生长素受体*TIR1*的功能研究大都集中在植物根系的生长发育方面, 有关果实生长发育方面的研究还鲜有报道。桃(*Prunus persica*)作为以果实为价值体的重要果树之一, 其果实品质的好坏直接影响其经济价值。因此, 本研究中, 我们以桃品种‘小白凤’不同发育时期的果实为实验材料, 鉴定

收稿 2018-02-01 修定 2018-04-17

资助 国家自然科学基金(31601727)、江苏省自然科学基金(BK-20160360)和苏州市农业科技创新项目(SNG201623)。

* 通讯作者(627306810@qq.com)。

了该品种桃果实中miR393b的精确序列, 克隆得到了预测靶基因生长素受体*TIR1* (XM_007201661.2)的序列, 分析了桃miR393b及其靶基因*TIR1*在桃果实不同发育时期的空间表达情况, 并进一步利用RLM-5' RACE和qRT-PCR鉴定了桃miR393b作用于*PpTIR1*的剪切位点并检测了作用频度, 为进一步研究miRNA调控生长素信号途径参与桃果实发育的分子机制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以水蜜桃(*Prunus persica* L.)品种‘小白凤’成年树上的不同发育阶段的果实作为实验材料。分别于花后20 d (果实第一次迅速生长期)、花后50 d (果实硬核期)、花后75 d (果实第二次迅速生长期)和花后90 d (果实成熟期)取样。样品采自苏州农业职业技术学院合作试验基地, 采集的所有样品带回实验室于液氮中速冻并放置在-70°C保存。

1.2 引物合成及生化试剂

本实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 其序号及序列见表1。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 由本实验室保存。Power Script IITM反转录酶购自Clontech公司, DNase酶I、Taq酶、pMD19-T载体、dNTPs、DNA Marker、荧光定量染料SYBR Green I均购自上海东洋纺生物科技有限公司, DNA回收试剂盒、DL2000 Plus DNA Marker由北京全式金生物技术有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 RNA的提取纯化及miRNA的分离

桃不同发育阶段果实中总RNA的提取采用改良的CTAB法(Zhang等2013), 用DNase I酶(RNase free)消化和氯仿抽提, mRNA的纯化采用PloyA Tract[®] mRNA Isolation System IV试剂盒, 按照说明书进行操作。在总RNA的基础上, 用4 mol·L⁻¹ LiCl分离出低分子量RNA (LMWRNA)与mRNA (Zhang等2013)。

1.3.2 cDNA合成

LMWRNA与mRNA的cDNA合成参考Zhang等(2013, 2014)的方法。

1.3.3 桃miR393b的精确序列验证

以1.3.2节中合成的LMWRNA的cDNA为模板, 用表1中的引物进行PCR扩增, miR-RACE方法参照Wang等(2011)进行。

1.3.4 靶基因*TIR1*的克隆

根据从桃的基因组中预测的miR393b及其靶基因*TIR1*的序列(Zhang等2013), 以纯化所得的低分子量RNA (LMWRNA)和mRNA反转录的cDNA为模板, 用表1中的引物进行PCR扩增, 以获得桃品种‘小白凤’中miR393b的精确序列及其靶基因*TIR1*的ORF序列。获得的*PpTIR1*的序列在NCBI中进行BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对。利用保守结构数据库(CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)进行保守结构域的分析。序列比对利用ClustalX和DNAMAN 5.22软件。系统进化树的构建使用MEGA 5.0软件。

表1 实验中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	用途
<u>TTTTTTTTT</u> GATCAATGCGATCCCTT	GGAGTAGAAATTCCAAAGGGATCGCAT	Ppe-miR393b序列克隆
TCCAAAGGGATCGCATTGATC	ATTCTAGAGGCCGAGGCGCCGACATG	Ppe-miR393b qRT-PCR
ATGCTGAAAATGGCGAACTC	TCAAGTAACCCTACTGCAGA	<i>PpTIR1</i> ORF扩增
AGTGACTIONGGGCTTCATCA	GACCAGCGACGGACCTATAA	<i>PpTIR1</i> qRT-PCR
AGGACTGACATGGACTGAAGGAGTAG	GACCAGCGACGGACCTATAA	RLM-5' RACE及qRT-PCR
CTCGCAACGGATATCTCGGCTCT	CTAATGGCTTGGGGCGCAACTTG	5.8S rRNA扩增
GCTCGCTGTTTTGCAGTTCTAC	AACATAGGTGAGGCCGCACTT	<i>RPII</i> 扩增
CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAU- GGACUGAAGGAGUAGAAA		LMWRNA 5'接头
ATTCTAGAGGCCGAGGCGCCGACATG- d(T)30(A, G, or C)(A, G, C, or T)		cDNA合成

上游引物和下游引物带下划线的部分分别与3' poly(A)_n和5'接头互补。

1.3.5 RLM-5' RACE

以1.3.2节中合成的mRNA的cDNA为模板, 特异引物的设计及反应参照Wang等(2011)方法, 采用GeneRacer试剂盒(Invitrogen Life Technologie, Carlsbad, CA)参照说明书进行操作。利用RLM-5' RACE克隆产物的测序结果与靶基因序列比对, 鉴定靶基因上是否存在miRNAs的剪切位点(Sun等2014)。

1.3.6 实时荧光定量RT-PCR

分别以sRNA、mRNA以及加3' ploy(A)尾巴和加5'端接头的纯化mRNA反转录合成的cDNA为模板, 以5.8S rRNA (CP002686) (Zhang等2013, 2014)和桃RPII基因(Tong等2009)为内参进行qRT-PCR扩增。试验重复3次, 试验数据用LinRegPCR和Excel 2010软件分析。目的基因的引物见表1。

2 实验结果

2.1 桃miR393b的精确序列验证及分析

根据前期在桃基因组中预测的桃miR393b序列, 利用miR-RACE技术验证了其在桃品种‘小白凤’中的精确序列。结果表明, Ppe-miR393b的验证序列与预测序列在末端核苷酸位置表现出一定的差异(表2), 即在序列5'端存在1个碱基的差异。同时, 将Ppe-miR393b的验证序列与miRBase 22数据库(<http://www.mirbase.org/index.shtml>)中其他物种的同源miR393b的序列进行比较发现, 序列间的差异仅存在于3'端(表3)。以上结果表明不同物种或同一物种不同品种间同源miRNAs序列确实存在一定程度的差异, 且大多发生在miRNA序列的两端, miR393b序列在不同物种或品种间存在差异的原因可能是由miRNA的进化程度不同造成的。

表2 Ppe-miR393b的预测序列与验证序列之间的比较分析

Table 2 Comparison the sequences of predicted and validated Ppe-miR393b

桃miRNAs	Ppe-miR393b
预测序列	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC
验证序列	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC

2.2 靶基因PpTIR1的克隆与序列分析

以桃不同发育时期果实cDNA为模板, 克隆得到PpTIR1 (XM_007201661.2)的完整ORF序列, 大小为1 755 bp, 编码584个氨基酸, 推测其分子量为65.57 kDa, 等电点为5.6。PpTIR1所编码的氨基酸序列与李、苹果、梨和龙眼等物种的TIR1编码的氨基酸序列比对发现, PpTIR1与李、苹果、梨、森林草莓等物种的TIR1序列具有高度保守性, N端均含有1个高度保守的FBOX DNA结合域(图1)。

通过MEGA软件构建了包括PpTIR1在内的14个TIR1蛋白家族的系统进化树, 图2显示PpTIR1与李TIR1的亲缘关系最近, 其次为苹果和梨。

2.3 桃miR393b与其靶基因的表达及相关性分析

为进一步了解桃miR393b的功能, 我们利用qRT-PCR技术检测了其在不同发育阶段果实中的空间表达水平。Ppe-miR393b在不同发育阶段的果实中表达水平不同, 在果实发育的四个阶段中, 其表达量从果实第一次迅速生长期至硬核期下降, 到果实第二次快速生长期以及果实成熟期, 其表达量呈现上升趋势, 且在果实成熟期表达量达到最高(图3-A)。这一结果表明Ppe-miR393b的表达是发育阶段特异的。为了解Ppe-miR393b的靶基因PpTIR1的功能, 我们对PpTIR1在桃四个不同发育阶段的空间表达也进行了分析。结果表明靶基因

表3 Ppe-miR393b与其他物种中同源miR393b的序列比较

Table 3 Sequence alignment among Ppe-miR393b and its orthologs in other species

来源	miRNA ID	miRNA核苷酸顺序(5'→3')																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
桃	Ppe-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	
草莓	Fve-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	<u>U</u>
苹果	Mdm-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	<u>U</u>
葡萄	Vvi-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	
水稻	Osa-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	<u>U</u>
拟南芥	Ath-miR393b	U	C	C	A	A	A	G	G	G	A	U	C	G	C	A	U	U	G	A	U	C	<u>C</u>

加下划线碱基为与桃miR393b的序列存在差异的位置。

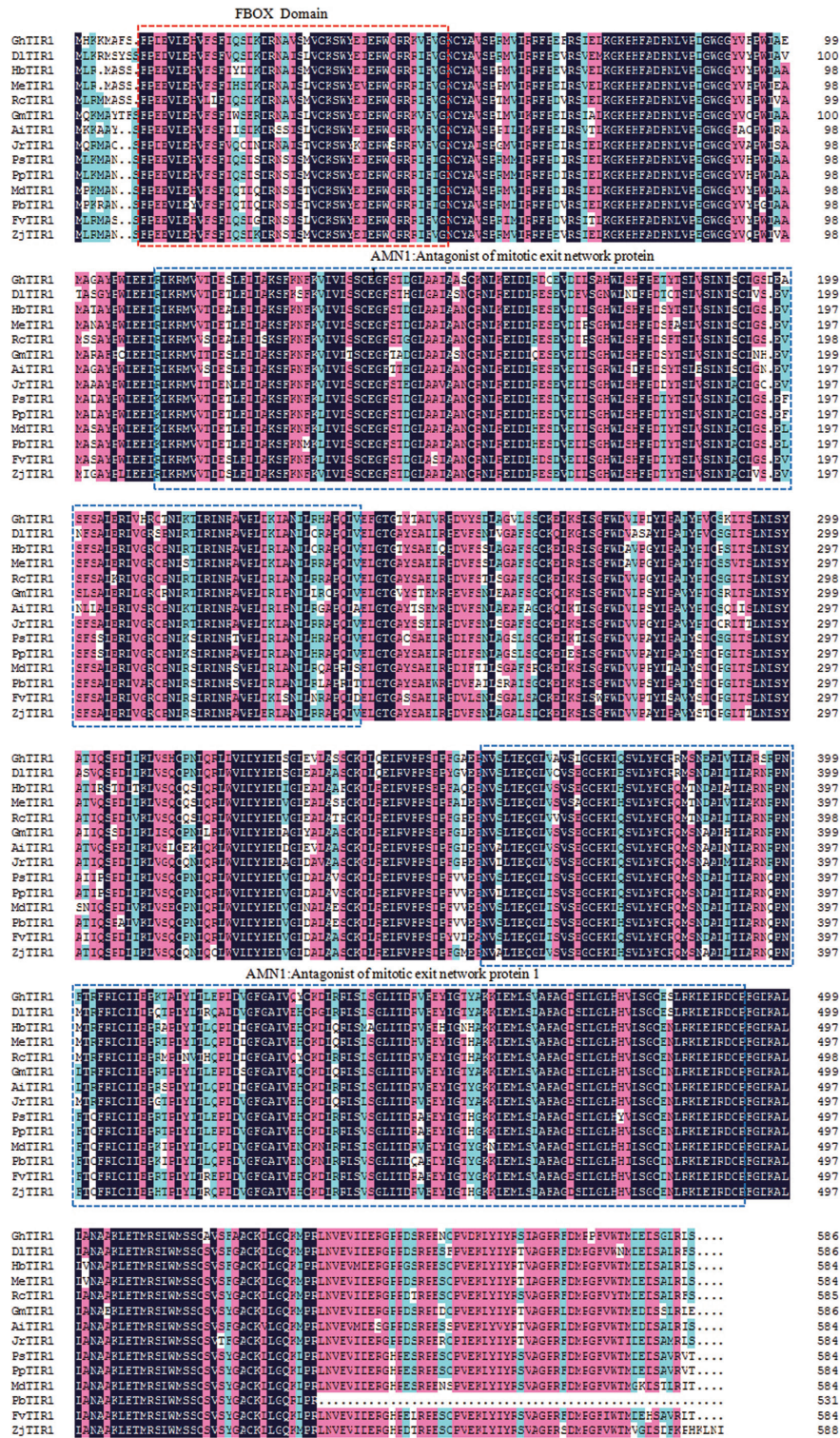


图1 *PpTIR1*基因推测的蛋白序列与其他植物TIR1蛋白的同源比对

Fig.1 Homology alignments of the deduced protein of *PpTIR1* gene and TIR1 proteins in other plants

图中所用其他物种中的TIR1氨基酸序列均下载自NCBI数据库。Gh (*Gossypium hirsutum*): 陆地棉; DI (*Euphoria longan*): 龙眼; Hb (*Hevea brasiliensis*): 橡胶; Me (*Maninot esculenta*): 木薯; Rc (*Ricinus communis*): 蓖麻; Gm (*Glycine max*): 大豆; Ai (*Arachis hypogaea*): 花生; Jr (*Juglans regia*): 核桃; Ps (*Prunus salicina*): 李; Pp (*Prunus persica*): 桃; Md (*Malus × domestica*): 苹果; Pb (*Pyrus × bretschneideri*): 梨; Fv (*Fragaria vesca*): 森林草莓; Zj (*Ziziphus jujuba*): 枣。

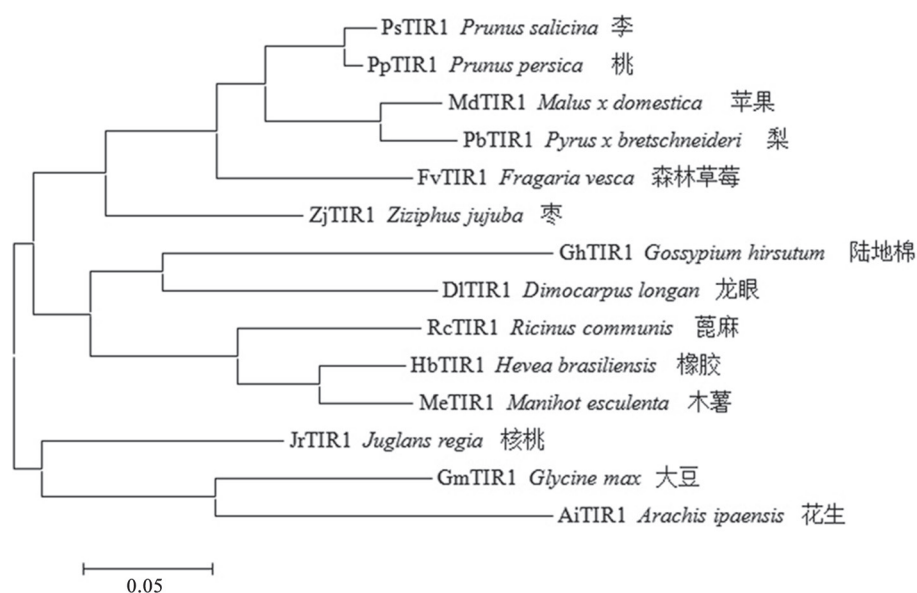


图2 *PpTIR1*基因推测的蛋白序列与其他植物TIR1蛋白的进化树分析
Fig.2 Phylogenetic analysis of deduced protein of *PpTIR1* and TIR1 proteins in other plants
采用Neighbor-joining方法。

*PpTIR1*在不同的果实发育阶段中均能检测到不同程度的表达, 其中在果实硬核期表达量最高, 在果实成熟期表达量最低, 表明*PpTIR1*在果实不同发育阶段有不同的空间表达情况(图3-B)。

分析miRNA与其靶基因在不同组织中或同一组织不同发育阶段表达情况的相关性是了解miRNA与其靶基因作用模式的一种重要手段。*Ppe-miR-393b*与其靶基因*PpTIR1*的相关性分析发现它们之间有显著的负相关关系, 相关系数 R 为-0.96。由此我们推测*Ppe-miR393b*负调控其靶基因*PpTIR1*, 且*PpTIR1*在一定程度上可能被*Ppe-miR393b*裂解, 这与大多数植物miRNAs作用于对应靶基因的模式相同。

2.4 桃miR393b与其靶基因的作用模式分析

为进一步验证*Ppe-miR393b*与其靶基因*PpTIR1*之间的作用模式, 利用表1中的引物, 用加poly(A)尾巴和5'接头的mRNA反转录合成的cDNA为模板进行5' RLM-RACE实验验证。结果表明, *Ppe-miR393b*以裂解的方式作用于靶基因*PpTIR1*, 在*Ppe-miR393b* 5'端的第10和11碱基之间以及第8和9碱基间均存在裂解位点, 但第10和11碱基之间裂解位点的裂解频度显著高于第8和9碱基间裂解位点的裂解频度(图4)。该研究结果证明了*Ppe-miR-*

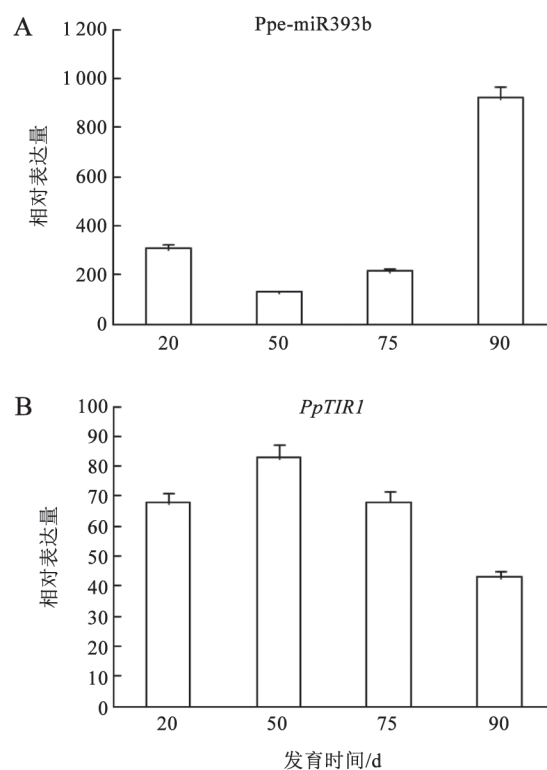


图3 *Ppe-miR393b*与其靶基因*PpTIR1*在不同发育阶段果实中的表达情况
Fig.3 Relative expression of *Ppe-miR393b* and its target gene *PpTIR1* in different stages of peach fruit

393b与其靶基因生长素受体TIR1间的裂解作用模式。

为了进一步了解靶基因*PpTIR1*裂解产物在不同发育时期果实中的表达水平以及其与Ppe-miR393b和*PpTIR1*表达之间的关系,我们利用qRT-PCRs技术进一步检测了*PpTIR1* 3'端裂解产物在不同发育阶段果实中的表达情况。实验结果显示*PpTIR1*的3'端裂解产物在不同发育阶段果实中的表达水平不同(图5),且靶基因*PpTIR1* 3'端裂解产物在不同发育阶段果实的表达趋势与Ppe-miR393b和靶基因*PpTIR1*的表达趋势无明显直接关系。

3 讨论

miR393在植物中的成熟序列具有高度保守性,本研究前期从桃的基因组中预测到了2个miR393的存在,分别为Ppe-miR393a和Ppe-miR393b,并且已验证了Ppe-miR393a的精确序列及其与其靶基因之一*AFB2* (ppa003465m)间的作用模式(Zhang等2014)。为更进一步了解Ppe-miR393在桃果实生长发育中的作用,依据前期基因组中的预测数据,我们发现Ppe-miR393b的靶基因之一为生长素受体基因*TIR1*,这一结果表明桃中miR393可能靶向生

长素受体基因*TIR1*从而调控生长素信号途径。为验证这一推测并了解Ppe-miR393b靶向*TIR1*的作用模式,本文首先验证了在水蜜桃品种‘小白凤’中Ppe-miR393b的精确序列,实验结果表明Ppe-miR393b的成熟序列在不同的物种间存在一定的碱基差异,且差异序列均在它们的末端核苷酸位置,这与之前报道的植物miRNAs序列的碱基差异大多发生在序列的两端一致(Felippes等2008)。不同物种或同一物种不同品种间miRNAs序列差异产生的原因可能是miRNAs在物种间进化的结果。验证Ppe-miRNAs的精确序列可以为进一步研究miRNAs的进化、调控作用、作用机理以及生物发生机制提供基础。

TIR1作为生长素受体,直接参与生长素信号通路,目前的研究表明miR393靶向生长素受体基因TIR1在植物的生长发育及逆境胁迫等方面发挥着重要的调控作用(Bian等2012; Bai等2017; Xu等2017; 赖瑞联等2016)。本研究中利用同源克隆技术,从桃果实的cDNA中分离得到了桃的TIR1同源基因*PpTIR1*并与李、苹果、梨和龙眼等物种中的TIR1进行了同源序列比对及亲缘关系分析,结果表明*PpTIR1*在不同的植物物种之间具有高度的保守性,功能也具有保守性,作为生长素受体参与生长素通路调控。进化树亲缘关系分析表明,桃的TIR1与李、苹果和梨等蔷薇科果树的亲缘关系最近,这也从分子水平验证了植物间的进化关系。

miRNAs与其靶基因在不同组织或同一组织不同发育时期的特异表达是miRNAs存在的有力证据且能够为它们的生理功能提供线索。本研究结果表明, Ppe-miR393b与其靶基因在桃果实不同发育阶段均有表达,且在4个发育时期中呈现先下降后上升的趋势,这一定量表达结果说明Ppe-miR393家族中不同成员间(Ppe-miR393a和Ppe-miR393b)的表达呈现出一定的差异(Zhang等2013),出现这一结果的原因可能是同一miRNA家族不同成员之间参与的生物学过程、主要作用时期、作用组织及作用强度均会存在差异。如Bian等(2012)的研究表明,在水稻中, miR393a在胚芽鞘尖端,冠根和侧根原基表达, miR393b在茎尖分生组织表达。

目前的研究表明多数植物miRNAs通过裂解



图4 RLM-RACE验证的*PpTIR1*的剪切位点
Fig.4 Cleavage sites of *PpTIR1* genes validated by RLM-RACE

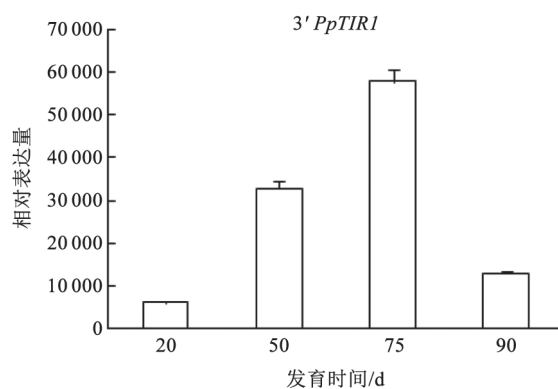


图5 *PpTIR1* 3'端裂解产物的表达
Fig.5 Expression of cleavage product of *PpTIR1* 3' end

方式在多种发育过程中负调控其靶基因(Mallory等2004; Felippes等2008)。分析miRNAs和对应靶基因的表达及二者之间的作用模式可以阐明miRNAs的功能。本实验利用RLM-RACE技术检测了Ppe-miR393b在其靶基因*PpTIR1*上的裂解位点(Sun等2014)。实验结果表明Ppe-miR393b裂解其靶基因*PpTIR1*, 且除在其他物种中报道的裂解保守位点即miRNA 5'端的第10和11个碱基之间外, 在第8和9位碱基间也存在裂解位点, 但第10和11个碱基之间的裂解频度要显著高于第8和9位碱基间的裂解频度。这一结果表明miRNA对其靶基因的裂解位点在不同的物种中既有一定的保守性, 又存在一定的多样性(Aukerman和Sakai 2003; Palatnik等2003; Wang等2011)。Ppe-miR393与其靶基因*PpTIR1*的表达相关性分析表明二者呈现显著的负相关, 这一结果也进一步验证了二者之间的裂解作用。本实验中3'端*PpTIR1*裂解产物的表达与对应Ppe-miR393b的表达趋势不完全一致, 这与之前的研究者在桃及其他物种中推测的结论存在一定的差异(Zhang等2014; 王梦琦等2017), 存在这一现象的原因可能是miRNA在转录和转录后水平参与植物发育的多个过程, miRNA不仅对其靶向的mRNA起作用, miRNA同时也可以和其他的RNAs如竞争性内源RNA (ceRNAs)或miRNA海绵(miRNA sponges)相互作用调控其自身或其他竞争性内源RNA (Franco-Zorrilla等2007; Le等2016)。因此, miRNA的表达与其对应靶基因裂解产物的表达并不一定完全正相关, 其中存在的具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献(References)

- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETA-LA2*-like target genes. *Plant Cell*, 15: 2730–2741
- Bai B, Bian HW, Zeng ZH, et al (2017). MiR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in barley. *Plant Cell Physiol*, 58: 426–439
- Bian HW, Xie YK, Guo F, et al (2012). Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/*TIR1* homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 196: 149–161
- Cao HY, Wang K, Gao HR, et al (2013). Research progress on microRNA involved in phytohormone response and biosynthesis. *Plant Physiol J*, 49: 1121–1126 (in Chinese with English abstract) [曹慧颖, 王可, 高何瑞等(2013). 植物激素相关microRNA研究进展. *植物生理学报*, 49: 1121–1126]
- Chen ZH, Bao ML, Sun YZ, et al (2011). Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 77: 619–629
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a). The F-box protein *TIR1* is an auxin receptor. *Nature*, 435: 441–445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, et al (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell*, 9: 109–119
- Dharmasiri N, Estelle M (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci*, 9: 302–308
- Felippes FF, Schneeberger K, Dezulain T, et al (2008). Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA*, 14: 2455–2459
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, et al (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 39: 1033–1037
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14: 787–799
- Lai RL, Lin YL, Lai ZX (2016). Cloning of auxin receptor gene *TIR1* and its interaction with miR393 in *Dimocarpus longan* Lour. *Chin J Appl Environ Biol*, 22: 95–102 (in Chinese with English abstract) [赖瑞联, 林玉玲, 赖钟雄(2016). 龙眼生长素受体基因*TIR1*的克隆及其与miR393互作关系. *应用与环境生物学报*, 22: 95–102]
- Lin DB (2012). Cloning and functional analysis of Sly-miR393 in tomato (dissertation). Chongqing: Chongqing University (in Chinese with English abstract) [林冬波(2012). 番茄Sly-miR393的克隆、鉴定及其功能研究(学位论文). 重庆: 重庆大学]
- Le TY, Zhang JP, Liu L, et al (2017). Computational methods for identifying miRNA sponge interactions. *Brief Bioinform*, 18: 577–590
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, et al (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 14: 1035–1046
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312: 436–439
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425: 257–263
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, et al (2009). Complex regulation of the *TIR1/AFB* family of auxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 22540–22545
- Sun X, Zhang YP, Zhu XD, et al (2014). Advances in identification and validation of plant microRNAs and their target

- genes. *Physiol Plantarum*, 152: 203–218
- Tong ZG, Gao ZH, Wang F, et al (2009). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 10: 71
- Vidal EA, Araus V, Lu C, et al (2010). Nitrate-responsive miR393/*AFB3* regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 4477–4482
- Wang C, Shangguan LF, Nicholas KK, et al (2011). Characterization of microRNAs identified in a table grapevine cultivar with validation of computationally predicated grapevine miRNAs by miR-RACE. *PLoS ONE*, 6: e21259
- Wang MQ, Xie ZQ, Sun X, et al (2017). Function analysis of miR159 and its target gene *VvGAMYB* in grape flower development. *Acta Horti Sin*, 44: 1061–1072 (in Chinese with English abstract) [王梦琦, 解振强, 孙欣等(2017). 葡萄miR159及其靶基因*VvGAMYB*在花发育过程中的作用分析. *园艺学报*, 44: 1061–1072]
- Xia K, Wang R, Ou X, et al (2012). *OsTIR1* and *OsAFB2* down regulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS ONE*, 7: e30039
- Xu J, Li J, Cui L, et al (2017). New insights into the roles of cucumber TIR1 homologs and miR393 in regulating fruit/seed set development and leaf morphogenesis. *BMC Plant Biol*, 17: 130
- Zhang YP, Bai YH, Han J, et al (2013). Bioinformatics prediction of miRNAs in the *Prunus persica* genome with validation of their precise sequences by miR-RACE. *J Plant Physiol*, 170: 80–92
- Zhang YP, Han J, Yu ML, et al (2014). Characterization of target mRNAs for *Prunus persica* microRNAs using an integrated strategy of PLM-RACE, PPM-RACE and qRT-PCR. *Sci Horti*, 170: 8–16

The interactive mode analysis between miR393b and its target gene *TIR1* in peach fruit

ZHANG Yan-Ping^{1,2,*}, LIU Zhao-Kun³, ZHU Xu-Dong⁴, WANG Chen⁴, LI Qing-Kui¹

¹Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008, China

²Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu 215009, China

³Suzhou Institute of Vegetable, Suzhou, Jiangsu 215000, China

⁴College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In this study, we accurately determined the precise sequence of peach miR393b by using miR-RACE PCR reactions, the target gene *PpTIR1* was also cloned with homology-based cloning and reverse transcription-PCR (RT-PCR) from *Prunus persica* ‘Xiao bai feng’. RLM-5' RACE and real-time RT-PCR were employed to validate the mode and frequency that Ppe-miR393b regulated its target gene *TIR1*. Observations showed that there was one nucleotide divergences at 5' terminal of miR393b between predicted and validated sequence. The open reading frame of *PpTIR1* was encoding a protein of 584 amino acids. Sequence alignment showed that *PpTIR1* contained a highly conserved FBOX DNA domain at N terminal. The RLM-5' RACE result showed that Ppe-miR393b could negatively regulate expression of its target genes by cleavage, and the target cleavage site were between the tenth and eleventh nucleotide and also between the eighth and ninth nucleotide at the 5'-end of the Ppe-miR393b. The cleavage frequency between the tenth and eleventh nucleotide site was significantly higher than the site between the eighth and ninth nucleotide. These results suggested that Ppe-miR393b is involved in the auxin signal process through negatively regulating the expression of its target gene *PpTIR1* by guiding cleavage.

Key words: peach; miR393b; TIR1

Received 2018-02-01 Accepted 2018-04-17

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601727), Natural Science Foundation of Jiangsu (BK20160360) and Agricultural Science and Technology Innovation Project of Suzhou (SNG201623).

*Corresponding author (627306810@qq.com).