

雌雄异型异熟胡桃楸性别分化关键 miRNA 的鉴定和分析

李京泽^{1,2} 张丽杰^{1,2*}

(1. 沈阳农业大学, 中国辽宁沈阳, 110000; 2. 辽宁省林木遗传育种重点实验室, 中国辽宁沈阳, 110000;)

摘 要:【背景】雌雄异型异熟是雌雄同株向雌雄异株转变的中间过渡形态。珍稀树种胡桃楸是雌雄同株异型异熟植物, 分为雌先型和雄先型两种类型, 其在东北地区是良好的经济树种和生态树种。MicroRNA (miRNA) 是一类内源性真核非编码 RNA, 其长度为 18-24nt 左右。在植物中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。但由 miRNA 介导的胡桃楸性别分化和雌雄异型异熟机制的形成尚不清楚。【结果】本研究利用高通量测序技术对胡桃楸雌雄先型的雌雄花芽进行 MicroRNA 测序分析, 构建了 12 个 sRNA 文库, 并与参考基因组进行对比, 共鉴定了 310 个已知的和 278 个未知的 miRNA, 对 miRNA 的长度、家族等信息进行统计。使用 DEG 软件包筛选出 129 个显著差异表达的 miRNA。对这些差异表达的 miRNA 层次聚类。使用 PSRobots 软件包预测了 638 个 miRNA 靶基因, 并对这些靶基因进行 GO (基因本体论) 和 KEGG (京都基因和基因组百科全书) 富集分析, 这些靶基因主要在代谢途径上富集, 并且在生殖、花发育和植物激素信号传导路径等成花相关途径中显著富集。推测 miR159c-3p, miR156d-3p, miR172d, miR171b, miR164a, miR167a, miR319a, miR399a、miR396t 可能是影响胡桃楸性别分化的关键基因, 其中 miR164a、miR167c 和 miR171c-5p 可能是胡桃楸雌雄异型异熟分化的关键基因。这些关键基因分别调控生长素、赤霉素等植物激素, 并靶向许多成花关键基因和转录因子。将这些关键 miRNA 和其靶基因共同建立了一个预测调控网络。随机选择 9 个差异显著的 miRNA 进行实时荧光定量 PCR 检测, 并结合转录组测序结果进行联合分析, 建立了一个差异 miRNA-差异 mRNA 的初级共表达调控网络。【结论】进一步发掘了这些 miRNA 在胡桃楸性别分化中起到了重要的作用, 揭示了 miRNA 与一些成花相关的重要转录因子之间的调控作用。与转录组数据联合分析为多组学揭示胡桃楸性别分化调控网络奠定基础。推测这些关键 miRNA 主要以调控胡桃楸靶基因的表达水平, 进而调控其激素分泌而影响性别分化, 如 miR159 家族调控 GAMYB 基因家族控制赤霉素的分泌, 通过赤霉素途径诱导性别分化等。并且形成了雌雄异型异熟这种由雌雄同株和雌雄异株之间的中间过度形态。该研究为最终发现胡桃楸性别分化和雌雄异型异熟的分子机制奠定了研究基础。

关键词: 胡桃楸、miRNA、雌雄异型异熟、性别分化

Identification and analysis of key miRNA for sex differentiation in hermaphroditic *Juglans mandshurica* Maxim.

Abstract: 【Objective】The dioecious heterozygous maturation is an intermediate transition form from monoecious to dioecious plants. The rare tree species *Juglans mandshurica* Maxim. is a dioecious heterozygous heteromorphic plant, which is divided into two types: female-first and male-first, and it is a good economic and ecological tree species in Northeast China. microRNA (miRNA) is a class of endogenous eukaryotic non-coding RNAs with a length of about 18-24 nt. In plants, they mainly regulate the expression of target genes by targeting complementary sequences, thus controlling many biological functions. However, the formation of miRNA-mediated sex differentiation and dioecious heterozygous maturation mechanisms in *J. mandshurica* is still unclear. 【Result】In this study, we used high-throughput sequencing technology to analyse the microRNA sequencing of male and female flower buds of the male and female phenotypes of *J. mandshurica*, constructed 12 sRNA libraries and compared them with the reference genome, and identified a total of 310 known and 278 unknown miRNAs, and counted the lengths, families and other information of the miRNAs. 129 significantly differentially expressed miRNAs were screened using the DEG package. these differentially expressed miRNAs were hierarchically clustered. 638 miRNA target genes were predicted using the PSRobots package, and these target genes were subjected to GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) enrichment analyses. these target genes were mainly enriched in the metabolic pathways, and were significantly enriched in flower-forming related pathways, such as the reproduction, floral development, and phytohormone signaling pathways. It was hypothesised that miR159c-3p, miR156d-3p, miR172d, miR171b, miR164a, miR167a, miR319a, miR399a, miR396t might be the key genes affecting sex differentiation in *J. mandshurica*, with miR164a,

miR167c, and miR171c-5p probably being the key genes in *J. mandshurica* miR164a, miR167c and miR171c-5p may be the key genes for sex differentiation in *J. mandshurica*. These key genes regulate phytohormones such as growth hormone and gibberellin, respectively, and target many flower-forming key genes and transcription factors. A predictive regulatory network was established by combining these key miRNAs and their target genes. Nine miRNAs with significant differences were randomly selected for real-time fluorescence quantitative PCR detection and jointly analysed with transcriptome sequencing results to establish a differential miRNA-differential mRNA primary co-expression regulatory network. 【Conclusion】 These miRNAs were further uncovered to play an important role in sex differentiation in *J. mandshurica*, revealing the regulatory roles between miRNAs and some important transcription factors related to flower formation. The joint analysis with transcriptome data lays the foundation for multi-omics to reveal the regulatory network of sex differentiation in *J. mandshurica*. It is hypothesised that these key miRNAs mainly affect sex differentiation by regulating the expression level of target genes in Nutmeg, which in turn regulates its hormone secretion, such as the miR159 family regulates the GAMYB gene family to control the secretion of gibberellin, which induces sex differentiation through the gibberellin pathway. And the formation of dioecious heterozygous maturation which is an intermediate excessive morphology between monoecious and dioecious. This study lays the research foundation for the final discovery of the molecular mechanism of sex differentiation and dioecious heterozygous maturation in *J. mandshurica*.

Keywords: *Juglans mandshurica* Maxim, miRNA, Heterosexualism, Sexual differentiation

雌雄异型异熟(L and H, 2012)是雌雄同株向雌雄异株转变的中间过渡形态(H, 2002; Shibata and Kikuchi et al., 2009; L and H, 2012; L and H, 2012; Jingjing and Xia et al., 2016)。按花的性别分化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, 并形成了两种交配群体, 即雌先型 (protogyny) 与雄先型 (protandry) (Shibata and Kikuchi et al., 2009; L and H, 2012; Chen and Mao et al., 2019; Eric and Noemi et al., 2019; Cao and Li et al., 2020)。在有花植物中, 雌雄异型异熟并不常见, 目前只在 13 科 20 属中发现, 且大多为被子植物(黄鹏与毛霞等, 2018)。

胡桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim.) 是胡桃科 (Juglandaceae) 胡桃属 (*Juglans*) 植物, 是中国北方珍贵的用材树种, 也是中国东北地区三大硬阔树种之一(王东娜与牟长城等, 2011)。在胡桃属植物中, 植物生殖类型主要分为两种, 且雌先型与雄先型群体大致比例为 1: 1(蔡佳友与秦柏婷等, 2022)。由于雌雄花开放时间不同, 当雌先型雌花开放时, 雄先型雄花正处于散粉阶段, 当雌先型雄花散粉时, 雄先型雌花处于开放阶段(Tatsundo and Shin-ichiro, 2014; 张丽杰与果冲等, 2019; Lijie and Chong et al., 2021)。在低密度种群中, 胡桃楸雌先型和雄先型的比值可能会有偏差, 这会导致单一形态主导的地区中缺乏交配对象 (Kimura and Goto et al., 2012)。这种现象将导致雌雄花间开花授粉时间不足, 严重影响了授粉率和坐果率, 进而导致了胡桃楸结实量和种子质量下降。

MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 20-24nt 的小型非编码 RNA, 在动物中它来源于单链 RNA 发夹前光标 (Dicer), 而在植物体内则来自于 Dicer-like1(DCL1)。miRNA 在植物中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(Guiliang and J et al., 2003; T and Noah et al., 2011)。miRNA 在植物体内遗传十分保守, 并在植物许多至关重要的发育过程中起着至关重要的作用, 如植物花芽分化、果实发育、激素合成等(Peng and Xi et al., 2010; Yingting and Junjie et al., 2021)。大量研究表明, miRNA 可以通过直接沉默靶基因的表达, 从而影响植物细胞的发育以及分化, 差异表达的 miRNA 还可以通过影响相关的

激素合成和其他信号转导等通路,从而间接地影响植物花的发育,导致雌蕊或雄蕊败育,进而导致性别分化(Cheng and Kailu et al., 2022)。因此,鉴定植物生命周期中关键 miRNA 的种类及其发挥的功能可以为植物的发育及性别分化研究提供新的方向。例如,在大花惠兰中,miR160 和 miR396 两个家族的差异表达分别能够靶向 ARFs 和 GRF 来调控花的发育(Li and Jin et al., 2015)。miR156/157、miR160 两个家族在核桃花芽分化中具有不同的作用(Zhou and Quan et al., 2018; 周丽, 2019)。对 miR396 和 miR408 的研究表明了这两个家族对文冠果的性别分化产生了影响(Wang and Zheng et al., 2019)。但目前胡桃楸性别分化与花芽分化方面在 miRNA 方向研究较少。

因此,本研究以生理分化期和形态分化期的雌雄异型异熟胡桃楸雌雄花芽为试材,使用 Illumina 测序技术对各时期雌雄花芽进行 miRNA 测序和转录组深度测序。分析不同发育时期雌雄花芽表达的 miRNA,并预测了不同差异 miRNAs 的靶基因。通过对结合转录组数据分析,确定了胡桃楸性别分化相关的关键 miRNA,并构建了初级调控网络,为胡桃楸性别分化机制的研究提供了参考信息。

1 研究方法

1.1 植物材料收集与制备

试验材料以辽东地区胡桃楸为研究材料,在 2021 年 4 月 2 日采集胡桃楸雌雄先型雌雄花芽,雌先型命名 C,雌花芽命名为 T1,雌花芽重复 3 次,分别为 C1、C2、C3;雄花芽命名为 T2,3 次重复分别为 C4、C5、C6;雄先型命名为 X,雌花芽命名为 M1,雌花芽重复 3 次,分别为 X1、X2、X3;雄花芽命名为 M2,3 次重复分别为 X4、X5、X6。样本数共 12 个。液氮速冻后保存在-80℃冰箱中,备用。

1.2 总 RNA 的提取和质量检测

使用 TRNzol Universal 试剂盒提取植物总 RNA,采用 RNA 专用琼脂糖电泳以检查 RNA 是否有降解和污染,使用分光光度计测试 RNA 浓度,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 系统检测 RNA 完整性。

1.3 小 RNA 的文库构建和上机测序

小 RNA 文库构建和测序在 Personalbio Technology (Shanghai, China) 进行。利用小 RNA 3'端和 5'端特殊结构,为其添加接头,反转录成 cDNA。利用 Lumina 的 TruSeq Small RNA Sample prep Kit 构建小 RNA 文库,之后对小 RNA 文库进行扩增和纯化。通过 Agilent High Sensitivity DNA kit 对文库进行质检,Quant-iT Pico Green dsDNA Assay Kit 对文库进行定量。最后使用 Illumina 平台 Single-End 模式测序。对原始数据去除适配器和低质量序列,选择 18-36nt 的 Clean reads (Total reads) 进行后续分析。对 Clean reads 数目进行统计,对样品中相同的序列进行去重处理并统计其丰度,称为 Unique Reads,用于后续的分析。在 Total Reads 和 Unique Reads 中,统计不同分组中共有和特有的序列数目。使用 MirDeep2 程序中的 mapper.pl 调用 bowtie,将 Unique Reads 与参考基因组数据库进行比对,将比对到参考基因组上的序列用于参与后续分析。

1.4 miRNA 鉴定与分析

利用 Blast 将 Unique Reads 与 Rfam13 数据库(<http://rfam.sanger.ac.uk/search/>)进行比对,从小 RNA 文库中将 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 筛选出来,其余未比对到的数据运用 Blast 与 miRbase22 数据库(<http://www.mirbase.org/>)比对,上述筛选错配数应小于 2。最后总结所有 Small RNA 和其它 RNA 的对比注释情况,为了给所有 Small RNA 提供一个唯一的注释,按此顺序排列已有的注释结果: known miRNA> rRNA> tRNA> snRNA> snoRNA> novel miRNA。

本研究分别对不同长度的 miRNA 首位上不同碱基的出现频率,和所有 miRNA 各个位置上不同碱基的出现频率进行统计。运用 Blast 对 miRBase 数据库中胡桃楸的近缘物种进行比对,观察对比到的 miRNA 在物种间的保守情况。保守的 miRNA 使用 miFam.dat 寻找家族。根据对比到保守 miRNA 的序

列数量,统计 miRNA 的 Reads Count 值,计算其 CPM 值。根据优化过 2018 年 Axtell 等人发布的基于测序来源的植物 miRNA 鉴定标准(J and C, 2018; Selinge and Yunyun et al., 2020),统计本次测序获得的 miRNA 数量。整理各样品保守 miRNA 的表达量,采用 DESeq (version 1.18.0) 分析差异表达的 miRNA (DEG),筛选标准为差异表达显著性 (p-value) 和表达量倍数差异 (fold change) >2 或 <0.5 。最后获得所有分组的差异表达基因,使用 R 中 Pheatmap 软件包对基因和样品进行双向聚类分析。

1.5 miRNA 靶基因预测和分析

以胡桃楸的 3'端 UTR 序列为目标序列,使用 psRobot.tat 软件对差异表达的 miRNA 序列进行靶基因预测。对靶基因进行基因本体论 (GO) 富集分析,先将所有靶基因映射到 Gene Ontology 数据库中的各个 Term,统计每个 Term 的靶基因数目,采用超几何分布计算靶基因显著富集的 Term, $FDR < 0.05$ 即视作显著富集。使用京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 数据库对靶基因进行 KEGG 富集分析,我们统计各个 KEGG Pathway 不同层级上包含的靶基因数目,进而确定靶基因主要参与的代谢途径和信号通路, FDR 值 < 0.05 则视作显著富集。确定与 DEGs 相关的目的基因所行使的主要生物学功能、参与的生化代谢途径和信号转导途径 ($qvalue < 0.05$)。并依据 sRNA 的表达量、富集分析结果以及在相关 miRNAs 在其它植物的研究进展,确定关键 miRNA。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

随机选择 9 个差异表达的 miRNA,通过 QRT-PCR 检测其表达谱,验证本次 sRNA 测序的准确性。用 TIANGEN 试剂盒提取总的 RNA,使用 PrimeScript 试剂盒和 Oligo(DT)逆转录成 cDNA,将按照反应体系配种的 PCR 反应溶液置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应。反应程序: 95°C for 5min, 95°C for 15sec, 60°C for 30sec, 40 个循环。以 U6 为内参基因,使用 $-2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因表达的相对定量,与 miRNA 测序表达量对比。

1.7 miRNA 测序和转录组测序联合分析

依据课题组胡桃楸花芽转录组数据分析,结合预测差异 miRNA 靶基因和转录组差异结果,找到差异 miRNA-差异 mRNA 的靶向关系,用 cytoscape 作图,并对被 miRNA 所靶向差异的 mRNA 进行功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 胡桃楸花芽中的 sRNA 图谱

为了鉴定新的 miRNA 并且研究 miRNA 在胡桃楸性别分化和雌先型雄先型转化过程中的作用,我们分别在雌先型雌蕊 (T1)、雌先型雄蕊 (T2)、雄先型雌蕊 (M1)、雄先型雄蕊 (M2) 四种类型构建了 12 个小 RNA 文库 (每个样本三次生物学重复)。对小 RNA 文库的深度测序生成了四个胡桃楸类型的小 RNA 平均原始读数,分别为 70099677、42177432、32725495、43655127。在去除接头,去除低质量的序列之后,选择长度为 18-36nt 范围内的读数 (Clean Reads)。共产生了 20 G 的干净数据,四种类型的平均读数为 38132413、33541027、25967944、35423485 (表 1),共占原始数据的 43.06%~82.42%。

对单样品内完全相同的序列进行去重并统计序列丰度,这些去重序列称为 Unique Reads。统计去重前后的序列长度分布可知,所得到的 sRNA 长短不一,去重前 T1 组 33nt 长度的 RNA 最丰富,而其它三组都是 24nt RNA 最丰富。去重后四组 sRNA 长度均主要分布在 21-24nt 之间,其中 24nt RNA 最丰富。分别在总序列和去重序列两个水平上,统计不同分组之间的共有特有序列数量。总序列中四个文库共有序列数为 316263574 (图 1-A),去重后共有序列数为 1043444 (图 1-B)。将 Clean reads 与参考基因组比对,比对结果如 Table2 所示,4 组样本平均超过三分之一的序列被映射到参考基因组上。说明本次 miRNA 数据质量可靠,可以用作后续分析。这些序列分布在胡桃楸的 16 条染色体上,其中 chr01 数量最多,chr12 数量

最少。(图 1-D)

表 1 12 个文库中小 RNA 数据汇总[□]

Tab. 1 Summary of small RNA data from 12 libraries

样本 Sample	原始 Raw		干净 Clean	
	读数 Reads	百分比 Percent	读数 Reads	百分比 Percent
C1	75030932	100.00%	32311388	43.06%
C2	66699406	100.00%	41329608	61.96%
C3	68568693	100.00%	40756243	59.44%
C4	36000737	100.00%	28708350	79.74%
C5	45679659	100.00%	35854209	78.49%
C6	44851900	100.00%	36060521	80.40%
X1	37878532	100.00%	30507307	80.54%
X2	29315373	100.00%	22424601	76.49%
X3	30982579	100.00%	24971925	80.60%
X4	60850957	100.00%	49519869	81.38%
X5	40191596	100.00%	32087576	79.84%
X6	29922828	100.00%	24663009	82.42%

□样本：文库名称 library name C:雌先型 female flower first mature individuals. X:雄先型 male flower first mature individuals. 123：雌花芽三次重复 Female flower buds are repeated three times.456：雄花芽三次重复 Male flower buds are repeated three times. 原始读数：测序产生的总数据 Total Data Generated by Sequencing. 干净读数：过滤后且长度大于 18nt 的序列数量 The number of sequences with a length greater than 18nt after filtering.

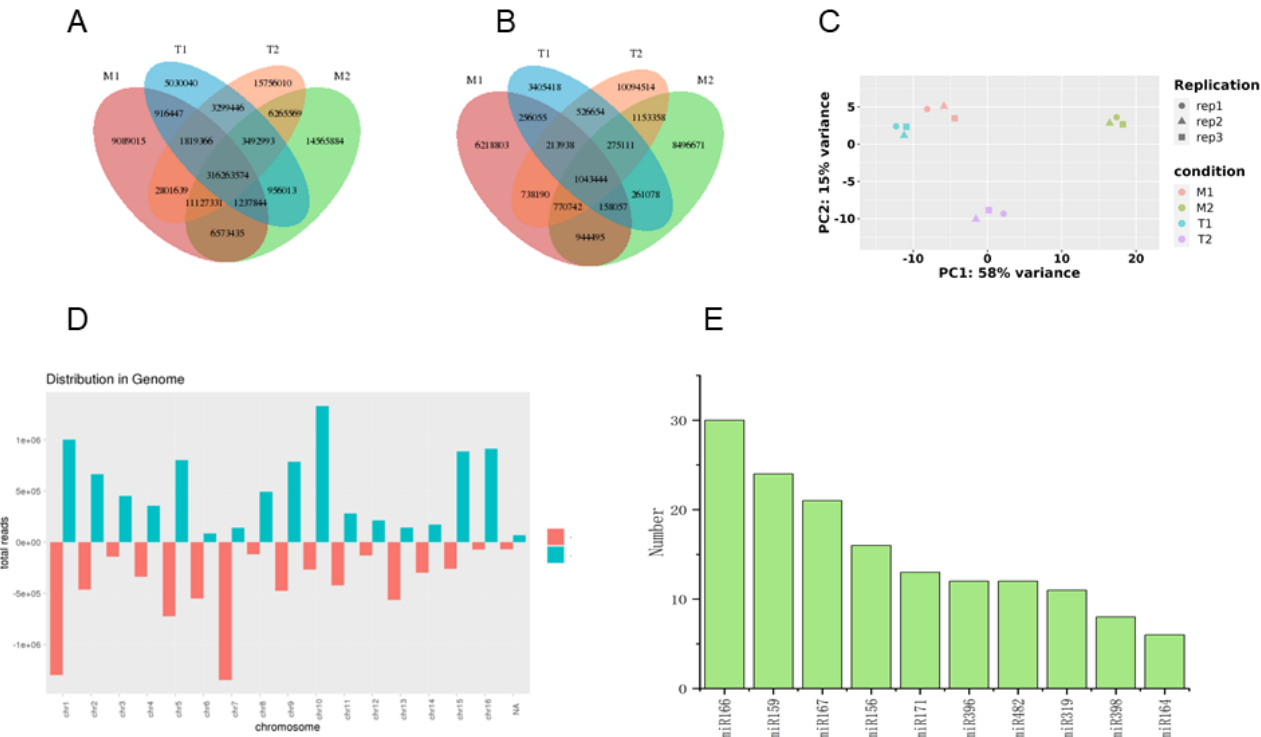


图 1 (Fig.1): A: 对序列总数做的 Venn 图, 交集为两组样本共同序列的总数. A: The Venn diagram of the total number of sequences, the intersection is the total number of common sequences of the two sets of samples. B: 去重序列在组间的 Venn 图. B: Venn diagram of deduplicated sequences among groups. C: 基因组分布图, 图中横轴为染色体编号, +/- 表示序列比对到染色体上的方向, 纵轴为正/反向比对到各个染色体上的序列丰度. C: Genome distribution map, the horizontal axis in the figure is the chromosome number, +/- indicates the direction of the sequence alignment on the chromosome, and the vertical axis is the sequence abundance of the forward/reverse alignment on each chromosome. D: 前 10 个保守 miRNA 家族中鉴定的成员数量. D: Number of members identified in the top 10 conserved miRNA families.

利用 Blast, 将 Unique Reads 与 Rfam13 数据库进行比对, 筛选出已知的四类 ncRNA (rRNA、tRNA、

snRNA 和 snoRNA)。将未对比到上述四类 ncRNA 的 reads 运用 Blast 与 miRBase22 数据库中植物的成熟 miRNA 序列进行对比,从中筛选出保守的 miRNA。最后对所有比对结果进行总结,大多数的 RNA 集中在 unknown 类别中,第二丰富的类别为 rRNA(图 2)。这表明可能还有许多非编码 RNA 在 unknown 类别中。

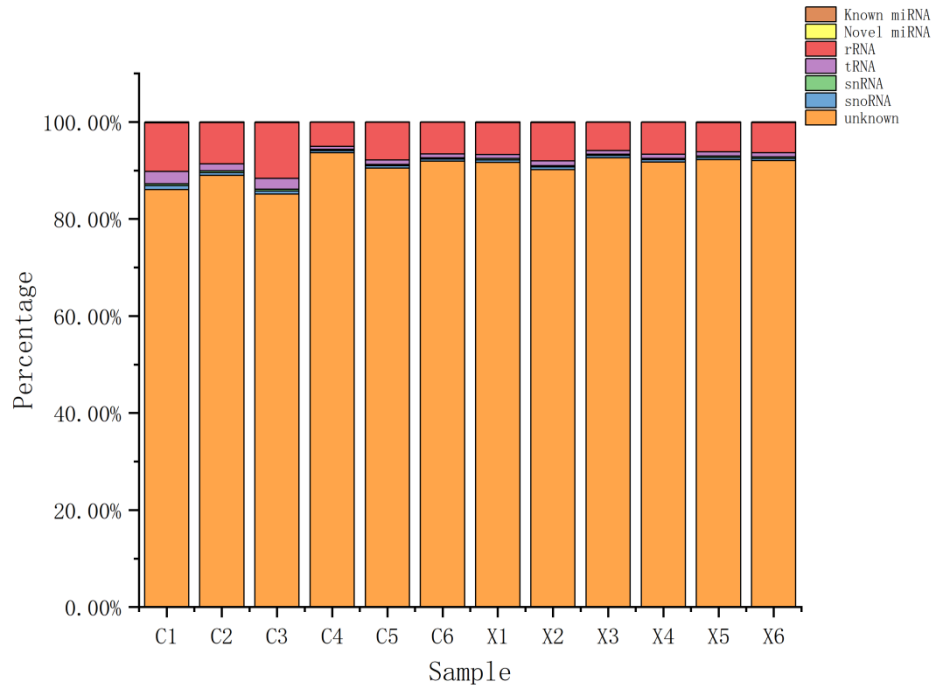


图 2 small RNA 分类统计图

Fig. 2 small RNA classification statistics

根据 miRBase 22.1 数据库的比对结果和 miRDeep2 预测结果,在 12 个文库中共检测到 310 个已知的 miRNA, 278 个未知 miRNA。miRNA 在植物中通常是保守的,保守的 miRNA 在已知的 miRNA 中鉴定了共 109 个 miRNA 基因家族,并已经证明在 68 个植物中是保守的。最大的 miRNA 家族是 MIR166,含有 30 个 miRNA 成员,其次是 MIR159、MIR167 和 MIR156,分别含有 24、21、16 个 miRNA 成员(图 1-E)。对胡桃楸 4 组样本 12 次重复做了 PCA 主成分分析(图 1-C),结果表明,胡桃楸组内重复聚在一起,表明它们的差异程度小,而胡桃楸组间差异大,说明样本之间差异明显,可以用于差异表达分析。

本次测序对胡桃楸 miRNA 进行了碱基偏好性分析。分析表明,长度为 19-23nt 长度的 miRNA 首位碱基对尿嘧啶(U)有偏好性,24nt 长度的 miRNA 首位碱基偏好腺嘌呤(A),25nt 长度 miRNA 首位碱基偏好鸟嘌呤(G)(图 3-A)。对 miRNA 各个位点的碱基偏好性进行分析表明,U 出现在前两个位置上频率相对较高,胞嘧啶(C)在前三个位置上出现的频率较低。23 和 24 位碱基对 U 和 C 有强烈偏好性,25 位碱基对 G 有强烈偏好性(图 3-B)。这之前研究结果一致。

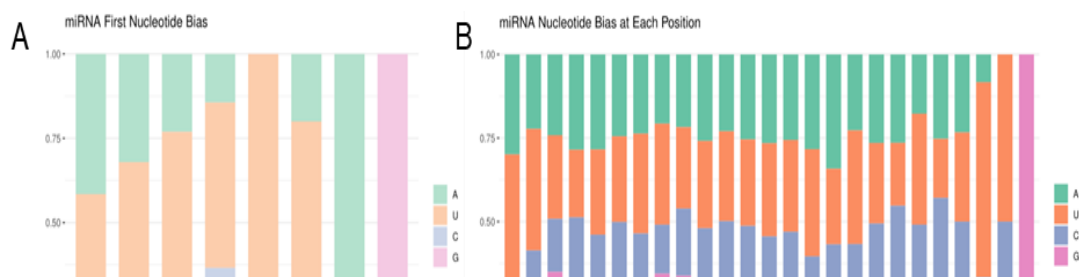


图 3 (Fig.3): A: 不同长度 miRNA 首位碱基的偏好性统计 A: Preference statistics for the first base of miRNAs of different lengths.B: miRNA 各个位点的碱基偏好性统计 B: Base preference statistics for each site of miRNA.

2.2 miRNA 差异表达分析

根据对胡桃楸花芽小 RNA 差异表达基因的筛选标准，我们得到了雌雄花芽 DEGs 对比文库：M1vsM2:107 个差异 miRNA， T1vsT2:85 个差异 miRNA; T1vsM1， 46 个差异 miRNA ;T2vsM2:65 个差异 miRNA，并统计各组间共有序列和特有序列(图 4-A)。四组共 12 个文库找到了 172 个差异的保守 miRNA，对差异 miRNA 统计丰度（图 4-B）。对四组差异基因进行聚类分析（图 5）。

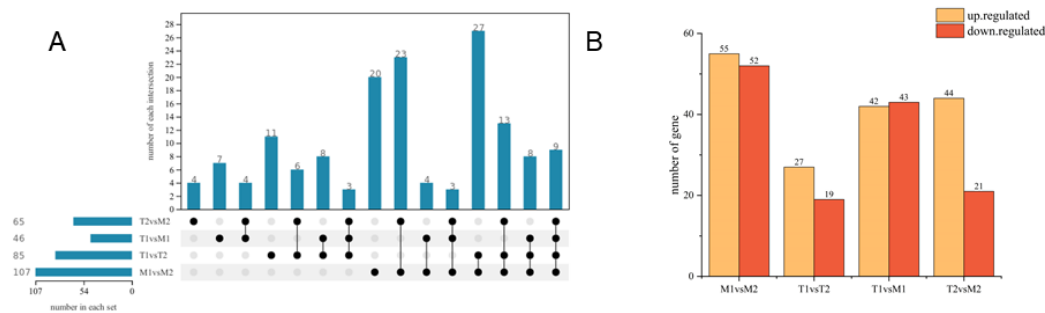


图 4 (Fig.4): 雌雄花蕾差异表达基因数 Number of differentially expressed miRNA in male and female buds A: 四组中差异 miRNA upset 图。A: Upset plot of differential miRNA in four groups .B: 各组差异 miRNA 调控方式和数量, 红色为上调, 绿色为下调 B: Mode and number of differential miRNA regulation in each group, red is up-regulated, green is down-regulated.

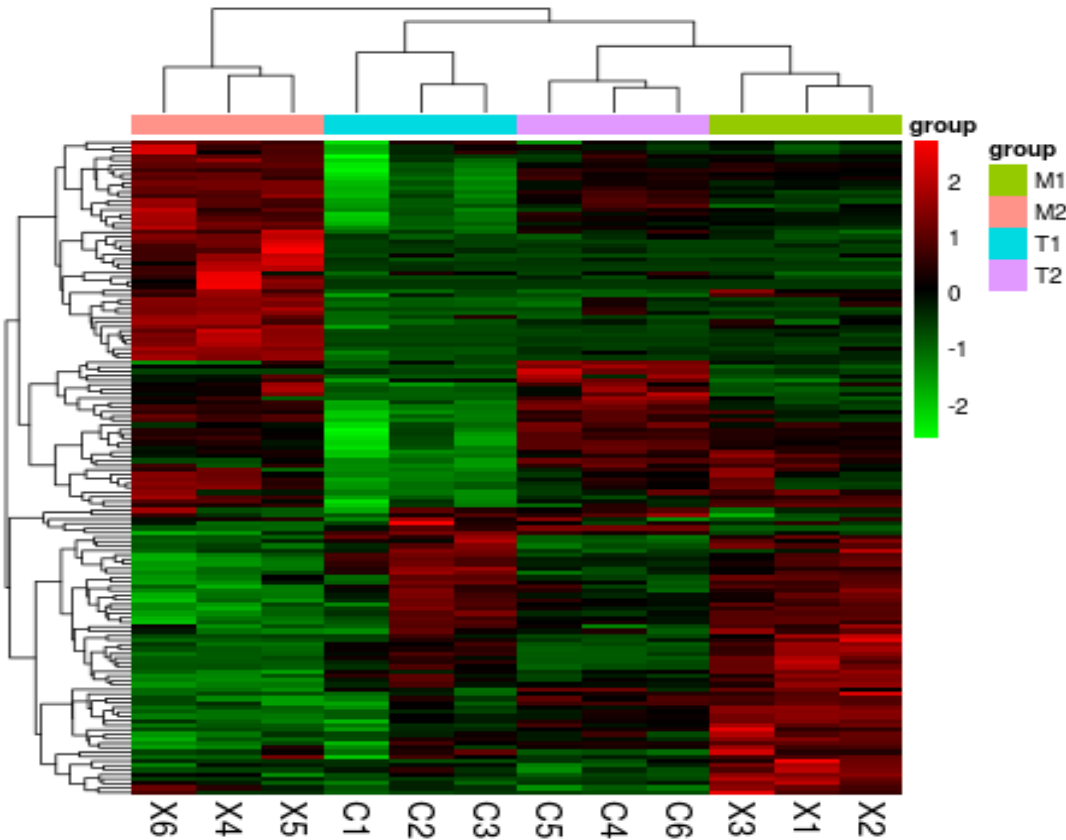
图 5: 差异表达 miRNA 聚类热图

Fig.5 Heat map of differentially expressed miRNA clustering

横向表示 miRNA，每一列为一个样本，红色表示高表达 miRNA，绿色表示低表达 miRNA。with miRNAs represented horizontally, one sample per column, high expression miRNAs in red and low expression miRNAs in green.

2. 3 靶基因预测与 GO、KEGG 富集分析

为了更好的了解 DEGs 的功能，我们对其靶基因进行预测，共有 638 个基因被预测为靶基因，预测到 2999 个 miRNA 与靶基因的结合位点。对靶基因预测结果显示，在 M1vsM2 分组中，共有 107 个差异表达



miRNA 靶向 1022 个潜在的 mRNA 位点，平均每个 mRNA/miRNA9.55 个。在 miRNA 中 miR159b-3p 和 miR159a 靶向最多的 mRNA（32）。大多数 miRNA 靶向多个位点，表明单个 miRNA 可以调控多个靶基因。然而，一个靶基因也可以被多个 miRNA 所靶向。共有 621 个 mRNA 可以被 1 个以上的 miRNA 调控，其中 12 个 mRNA 可以被 11 个 miRNA 靶向。根据 M1vsM2 中 DEG 的 GO 功能的分类注释，可以观察到共有 2954 个功能，其中生物学过程（BP）2117 个，细胞组分（CC）352 个，分子功能（MF）485 个。对 GO 功能显著富集意义分析（FDR<0.05），结果显示，M1 与 M2 显著富集了 178 个术语，其中 147 个术语属于生物学功能，4 个术语属于细胞组分，27 个术语属于分子功能（图 6-A）。富集项最多的一项是结合（GO:0005488）同时富集项包括雄蕊发育（GO:0048443）、雄激素发育（GO:0048466）、花器官发育（GO:0048438）等。表明了这些基因可能对 M1 与 M2 性别分化发挥了主导作用。

T1vsT2 有 85 个差异表达 miRNA 靶向 906 个 mRNA 位点，平均 mRNA/miRNA10.66 个。在这些被注

释到靶基因的 miRNA 中, miR159a-3p 靶向最多的 miRNA (37), 其次是 miR159b-3p.1 (34)。共有 604 个 mRNA 可以被 1 个以上的 miRNA 调控。根据 T1vsT2 中 GO 功能的分类注释结果可以观察到, 本组共有 2765 个功能被注释, 其中包括生物学功能 1980 个, 细胞组分 307 个, 分子功能 477 个。在矫正 P 值 (FDR) <0.05 的条件下进行筛选, T1vsT2 共显著富集了 238 个术语。其中 BP 有 20 个, CC 有 3 个, MF 有 26 个。富集项最多是代谢过程 (GO:0008152), 其次是结合 (GO:0005488) 和细胞代谢过程 (GO:0044237) (图 6-B)。

T1vsM1 中有 46 个差异表达的 miRNA 靶向 416 个 mRNA 位点, 平均 mRNA/miRNA 9.04 个。在这些 miRNA 中, miR159b-3p.1 和 miR159c 靶向最多的 mRNA (34), 其次是 miR159a (33)。共有 247 个 mRNA 可以被 1 个以上的 miRNA 靶向。GO 功能的分类注释结果表示, 本组共有 1653 个功能被注释, 其中包括 BP 1180 个, CC 183 个, MF 280 个。对 GO 功能显著富集意义分析表示, 163 个功能显著富集, 其中生物学功能 130 个, 细胞组分 5 个, 分子功能 19 个。富集项最多的是细胞代谢过程 (GO:0044237)、结合 (GO:0005488)、有机环状化合物结合 (GO:0097159) (图 6-C)。

T2vsM2 分组下有 65 个差异表达的 miRNA 靶向 656 个 mRNA 位点, 平均每个 mRNA/miRNA 10.09 个。miR172b-5p 靶向最多的 mRNA (30), 其次是 miR156l (25)。共有 401 个 mRNA 可以被 1 个以上的 miRNA 进行调控, 其中 12 个 mRNA 可以被 11 个 miRNA 进行调控。据 GO 功能的分类注释结果可以观察到, 本组共有 2476 个功能被注释, 其中包括生物学功能 1779 个, 细胞组分 272 个, 分子功能 425 个。GO 功能显著富集分析筛选出 154 个功能显著富集, 其中生物学功能 136 个, 细胞组分 3 个, 分子功能 15 个。富集项最多的是代谢过程 (GO:0008152), 其次是结合 (GO:0005488) 和细胞代谢过程 (GO:0044237) (图 6-D)。

我们对雌先型和雄先型整体做了差异表达分析和 GO、KEGG 富集分析, 结果表明, 共有 28 个显著差异表达的 miRNA, 其中上调基因 21 个、下调基因 7 个。GO 富集分析表明, 共有 299 个功能显著富集, 其中富集最多的功能是 cellular process (GO:0009987), 其次是 metabolic process (GO:0008152) 和 binding (GO:0005488)。

对四组进行 KEGG 富集分析, 结果表明, 四组富集最多靶基因的通路都是植物激素信号传导 (ko04075), 其次是内质网蛋白质加工 (ko04141) 和 MAPK 信号通路-植物 (ko04016)。同时, 对雌先型和雄先型整体的 KEGG 富集分析表明, 富集最多的靶基因通路为植物激素信号转导 (ko04075)、氨基糖和核苷酸糖代谢 (ko00520) 和 MAPK 信号通路-植物 (ko04016)。表明上述通路的靶基因无论对胡桃楸性别分化和雌雄异型异熟机制的形成都起到了至关重要的作用。

这些靶基因有许多转录因子, 与性别分化有着直接或间接的关系。例如, miR156 靶向的 SPL 基因家族, miR172 靶向的 AP2 家族, miR159 靶向的 MYB 家族和 miR171 通过靶向 SCL 基因家族可以用调控 GA 的合成和信号传导, miR160/167 家族调控的 ARF 基因家族可以调控生长素的信号传导等。

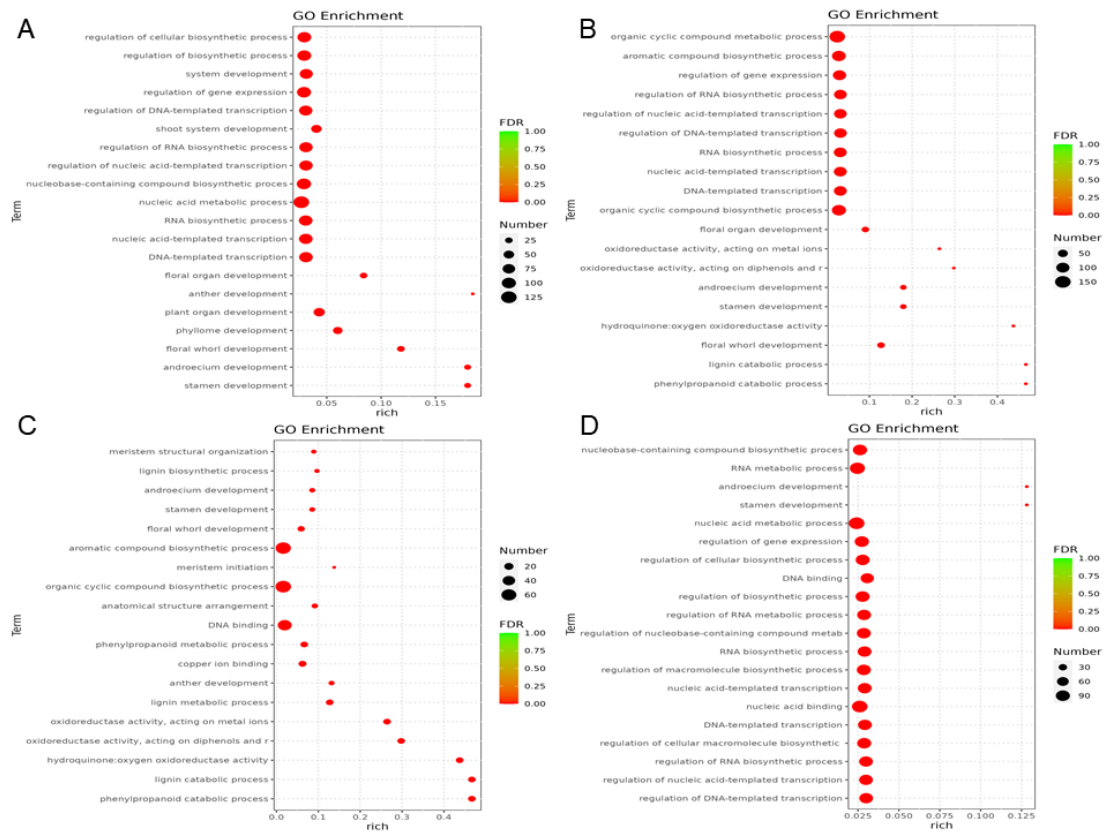


图 5: GO 富集分析

Fig .5: GO enrichment analysis

A: *M1* vs *M2*; B: *T1* vs *T2*; C: *M1* vs *T1*; D: *M2* vs *T2*

2.4 实时 PCR 验证基因表达

为验证高通量测序的 miRNA 的表达模式，我们随机选取 9 个 miRNA 进行了实时荧光定量 PCR 分析，所选 miRNAs 的表达趋势与测序结果一致（图 7），表明 sRNA 测序结果可靠。

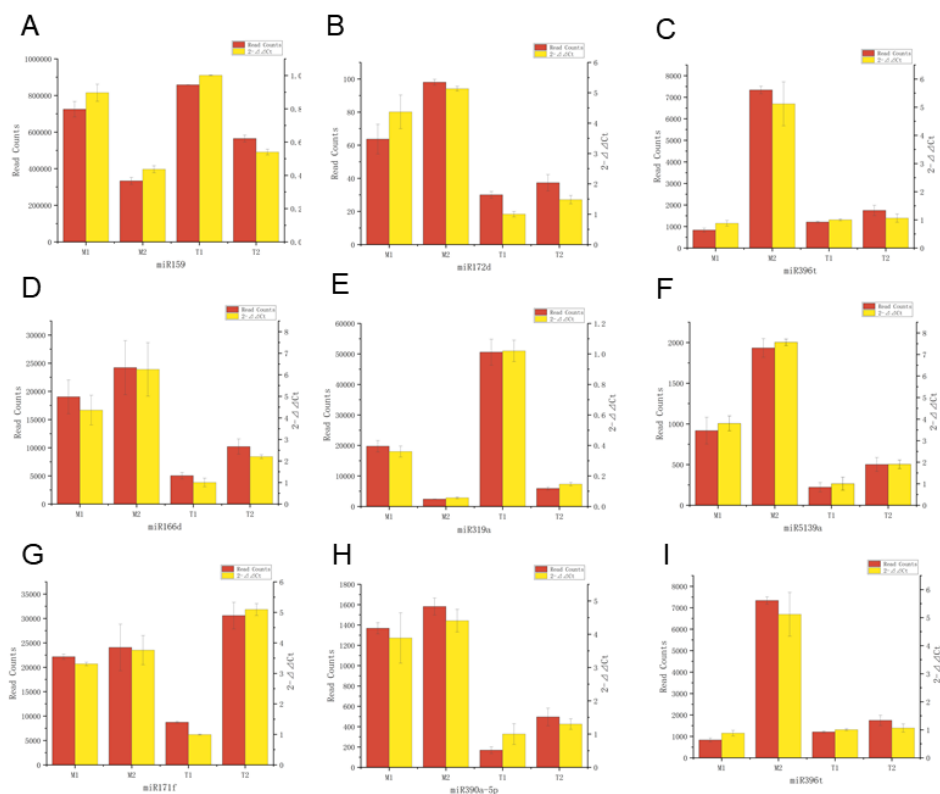


图 7: (A-I)使用 qRT-PCR 验证源自 miRNA-seq 的 9 个随机选择的差异表达基因

Fig.7: (A-I) Validation of nine randomly selected differentially expressed genes derived from miRNA-seq using qRT-PCR

2.5 关键 miRNA 的筛选

根据差异基因表达量、GO 和 KEGG 富集分析结果，结合其它植物性别分化研究，我们推测了出对胡桃楸性别分化以及雌雄异型异熟形成机制有重要影响的关键 miRNA（表 2），用 cytoscape 构建了一个关键 miRNA-mRNA 的靶向调控网络（图 8）

表 2:4 组中差异表达的关键 miRNA

Table.2: Four groups of key differentially expressed miRNA.

分组 Group	miRNA	DEM	Log2 Fold Change
M1vsM2	miR159c-3p	Down	-4.182016741
	miR399a	Down	-3.921752724
	miR319a	Down	-3.133464842
	miR171f-5p	Down	-2.485869043
	miR172d	Down	-1.630965443
	miR164-3p	UP	8.294286129
	miR167b	UP	6.595958558
	miR156b	UP	6.455034958
	miR156d-3p	UP	5.339716891
	miR171a	UP	4.132868324
	miR167c	UP	3.641872628
	miR396t	UP	2.903334354

T1vsT2	miR319a	Down	-4.000611515
	miR159c-3p	Down	-3.305003284
	miR319b	Down	-3.086782755
	miR172d	Down	-2.073500685
	miR167a	UP	2.921788545
	miR167b	UP	2.901437113
	miR171a	UP	2.771554322
	miR396t	UP	2.409984627
	miR319	UP	2.401037572
T1vsM1	miR166b	UP	2.274164037
	miR5139a	UP	2.039594749
	miR166c	Down	-5.189040491
T2vsM2	miR164a	UP	2.779404952
	miR166c	Down	-5.189040491
	miR164-3p	UP	10.00090635
	miR171c-5p	UP	6.912390786
	miR171b	UP	3.745594554

□分组: 实验组 vs 对照组 Experimental group vs control group. DEM: miRNA 显著变化情况 Significant changes in miRNA. Log2 Fold Change: 大于 0 为显著上调, 小于 0 为显著下调 Greater than 0 is significantly up-regulated, and less than 0 is significantly down-regulated.

图 8: 关键 miRNA 及其靶基因的网络调控图谱。

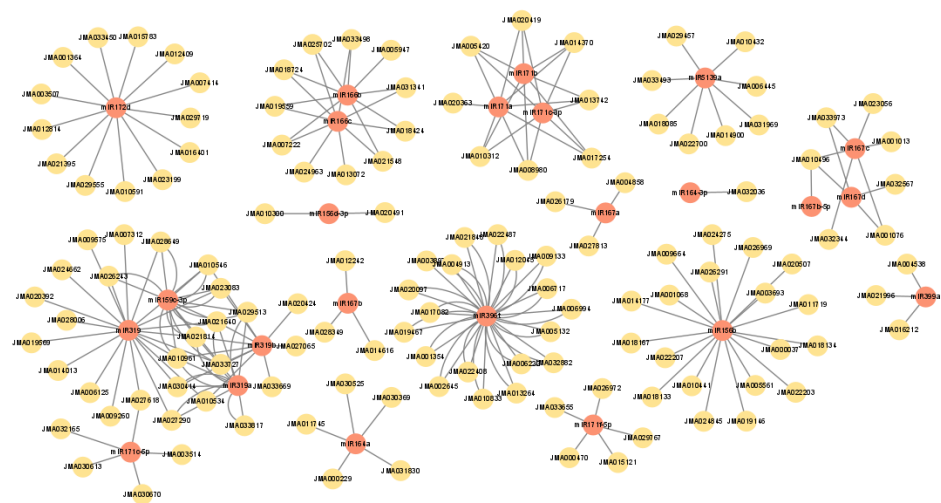


Fig.8: A network regulatory map of key miRNAs and their target genes.

该网络包括 161 个节点和 221 条边。红色的椭圆代表 miRNAs, 黄色的椭圆代表靶基因。The network contains 161 nodes and 221 edges. Red ovals represent miRNAs and yellow ovals represent target genes.

2.6 miRNA 测序与转录组测序联合分析

对 miRNA 预测的靶基因与转录组数据中显著差异表达的 mRNA 进行对比,找到对应的 mRNA(图 9),并对其进行 GO 功能富集分析。结果表明:M1vsM2 富集基因最多的功能是代谢过程(GO:0008152)。T1vsT2 为 regulation of biological process (GO:0050789) 功能富集了最多的基因。T1vsM1 为 regulation of biological process (GO:0007275) T2vsM2 为 cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)。四组显著都富集了性别分化相关功能,有机物生物合成过程(GO:1901576)生殖(GO:0003006)、花发育(GO:0009908)等。说明这些 miRNA 和 mRNA 在性别分化方向起到了关键的作用。

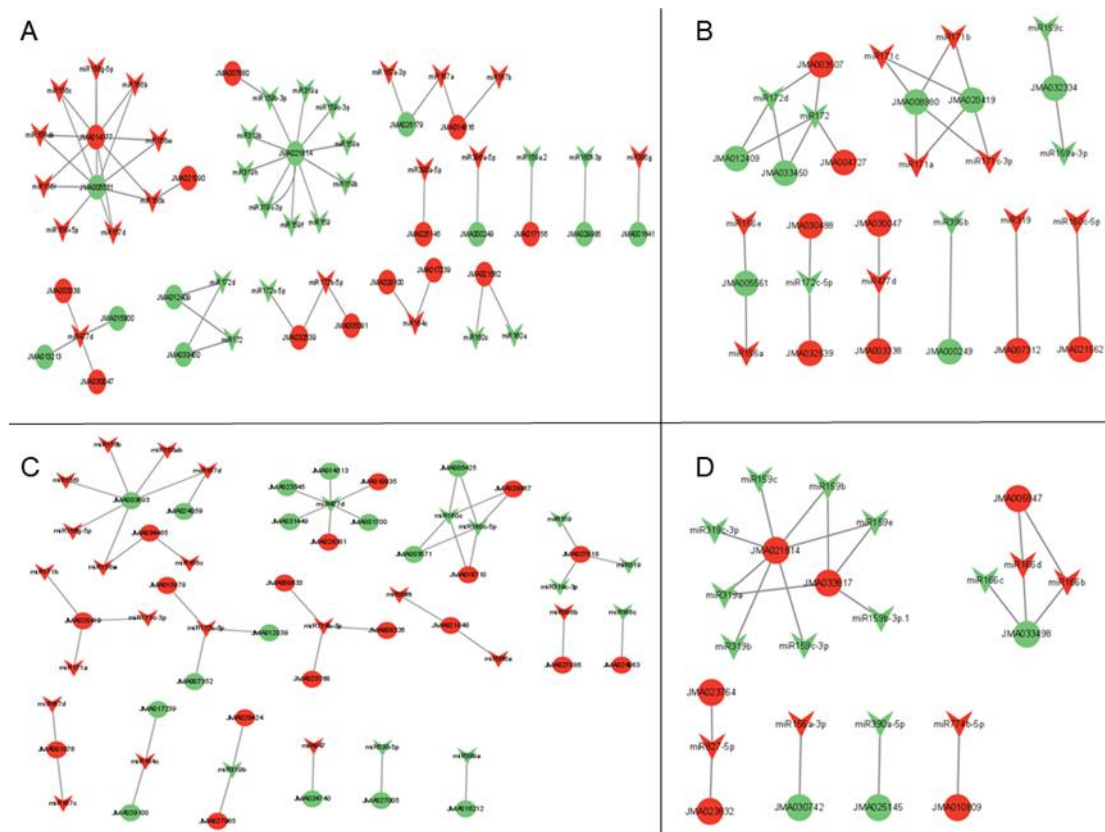


图 9: miRNA 与转录组联合分析图

Fig.9: Plots of combined miRNA and transcriptome analysis

A: M1vsM2; B: T1vsT2; C: T1vsM1; D: T2vsM2. V 字型代表显著差异表达 miRNA, 圆型代表差异表达的 mRNA。红色代表上调, 绿色代表下调。A: M1vsM2; B: T1vsT2; C: T1vsM1; D: T2vsM2. V represents significantly differentially expressed miRNAs, circle represents differentially expressed mRNAs. red represents up-regulated, green represents down-regulated.

3 讨论

近年来植物性别分化已经逐步成为学术研究的热门方向,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。miRNA 是植物体内一类重要的调控分子,在植物的性别分化过程中扮演了极其重要的角色(Jin and Mo et al., 2022), miRNA 和其调控的靶基因的表达显著影响着植物性器官的发育与转化(Waheed and Zeng, 2020; Liu and Li et al., 2023)。

本研究构建了胡桃楸雌先型雌花芽、雌先型雄花芽、雄先型雌花芽、雄先型雄花芽的 sRNA 文库, clean data 对比率表明测序质量良好。分析结果表明,胡桃楸雌先型和雄先型的雌雄花芽之间有明显的差异。miRNA 长度分布的统计结果表明,胡桃楸 24nt 长度的 miRNA 最丰富。对碱基偏好性的分析与之前的研究结果保持一致。4 组样本三次重复一共构建了 12 个文库,共检测到了 310 个已知 miRNA 和 278 个新的

miRNA。一共找到了 172 个 DEGs, 预测了 638 个靶基因和 2999 个靶基因切割位点。

胡桃楸生殖过程中性别分化以及雌雄异型早熟的特点不仅受到基因的直接调控, 激素调控在其中也起到了关键的作用。在对胡桃楸雌雄花芽差异 miRNA 靶基因 GO 功能富集分析中, 有许多基因归入到植物花器官发育, 雄蕊和雌蕊发育之中, 还有许多基因归入到生殖发育有关的生物学过程。在 KEGG 通路富集分析中, 植物激素信号传导富集了最多的靶基因。例如, 在本研究中, miR159 和 miR319 共同调控了 GAMYB 基因, GAMYB 可以响应 GA 信号(Gubler and Kalla et al., 1995), 而在黄瓜中已经证明 miR159 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(Yan and Xiaolan et al., 2014)。miR319 在拟南芥中与 miR159 有着极高的相似性, 本次测序发现, TCP4 和 MYB33 可以被 miR159 和 miR319 靶向, 而 miR167 被 TCP4 和 MYB33 抑制表达(Rubio-Somoza and Weigel, 2013), 从而促进了 ARF6 和 ARF8 这两个成花关键基因的表达。miR167 和 miR319 通过靶向 FTIP1 影响 FT 基因的表达(PÉREZ-QUINTERO and LÓPEZ, 2013; 胡帅与肖文君等, 2014; Liu and Liu et al., 2017; Bai and Lin et al., 2022)。miR319 和 miR159 在胡桃楸雌蕊中高度表达, 在雄蕊中表达量相对较低, miR167 则相反, 推测这三个 miRNA 家族对胡桃楸性别分化起到关键作用。miR319 在之前的研究中表明在植株中表达的范围和丰度都很小(F and Edwards et al., 2003; S and Junyan et al., 2010; F and Heike et al., 2019; Hu and Shen et al., 2019), 但在本研究中测得 miR319 表达量相对较高, 这与之前的研究结果不同。miR156 靶向 SPL 基因家族从而调控花发育和性别分化(张昱与张莉等; Martin and Asif et al., 2020), 在拟南芥中, SPL3/4/5 能直接激活 LFY, FUL 和 AP1 等 MADS-box 基因来促进开花, SPL9 可以正向调控花的启动子 FUL, SOC1, AGL42(Levi and Johannes et al., 2010), 也可以激活 miR172 的转录, 从而增加 miR172 的表达量, 诱导植物开花。miR172 可以靶向 AP2(Mehrpooyan and Othman et al., 2012; Ahsan and Hayward et al., 2019), 消除 AP2 对 FT 的抑制作用, 最终形成了 miR156-SPL-miR172-AP2 的调控通路(Yurong and Yang et al., 2020)。本次测序测得 miR156 家族都在雌蕊中表达相对较少, 在雄蕊中表达相对较多, miR172 则相反, 这与之前在其它物种的报道保持一致。ARFs、AFBs 和 TIRs 分别作为生长素应答因子、是生长素信号传导 F-box 蛋白、转运抑制物应答蛋白, 分别受到 miR160 和 miR390、miR167、miR393 家族的调控, 在胡桃楸中这四种 miRNA 在雌花的表达量显著低于雄花的表达量, 推测这四种 miRNA 家族通过间接调控生长素的分泌从而促进胡桃楸性别分化, 在雌蕊发育中起到重要的作用, 促进胡桃楸雄花向雌花转化。这与在拟南芥(Su and Wang et al., 2020)(Kuhn and Runciman et al., 2019)、番茄(C and Matthias et al., 2017; 谢洁与王明等, 2018)、春兰(Zihan and Qian et al., 2022)、草莓(Dong and Xiangxiang et al., 2022)等植物中研究结果保持一致。miR399 在水稻中能 miR156 共同影响 SPLs、花药壁木质素合成和类黄酮代谢途径影响其雄性育性(Yujun and Xinguo et al., 2021)。miR396 靶向生长素释放因子 GRF, 从而调控植物生长素分泌水平, 可以降低雌蕊育性(Shuangrong and Zhigang et al., 2020; Matías and Manuel et al., 2021; Fengxi and Chuqiao et al., 2022)。

miR167、miR164 家族和 miR171 家族在胡桃楸雌雄先型中表达有显著差异, 在雌雄先型雌雄花芽对比中 Foldchange 值极高, miR164 靶向的 NAC 基因家族在胡桃楸近似物种核桃中已有报道说明可能影响核桃雌蕊原基、雄蕊及叶芽原基的形成与发育(亢超, 2022)。miR171 在黄瓜中能影响赤霉素和生长素的传导相关基因(朱早兵与虞夏清等, 2019), 在番茄中参与花药发育, 过表达能使雄花不育(Kravchik and Stav et al., 2019; Han and Yun, 2022)。这些证据使我们推测 miR167、miR164 和 miR171 可能是胡桃楸雌雄先型性别分化的关键 miRNA 家族。

植物的性别决定是一个复杂的生物学过程,其中环境,年龄,基因以及激素分泌都影响着性别分化(Hu and Song et al., 2023)。miRNAs 在植物性别分化中通过抑制靶基因的表达而发挥其关键作用。本次研究推测,miRNA 主要以调控胡桃楸靶基因的表达水平,进而调控其激素分泌而影响性别分化,并且形成了雌雄异型异熟这种由雌雄同株和雌雄异株之间的中间过度形态。

4 结论

雌雄异型异熟胡桃楸生殖类型主要分为雌先型和雄先型两种,我们通过分别对胡桃楸雌先型雌蕊和雄花序、雄先型雌蕊和雄花序进行了 sRNA 测序研究,从 miRNA 角度研究了胡桃楸性别分化以及雌雄先型花发育过程。测序结果发现了 310 个已知 miRNA 和 278 个新的 miRNA,筛选出 172 个差异保守 miRNA,用 PSRobots 预测了共 638 个靶基因。GO 富集分析表明,这些靶基因主要参与了胡桃楸生殖、花发育等相关生物学功能,KEGG 富集分析表明富集最多靶基因的通路是植物激素信号传导。这些靶基因参与了包括 GA, IAA 等激素的信号传导。如:miR159 靶向的 GAMYB1、miR390 靶向的 ARF、miR393 靶向的 GRF 等。运用 QRT-PCR 随机验证了 9 个差异表达的 miRNA,证明了本次测序的准确性,与转录组测序联合分析构建了一个胡桃楸性别分化机制的初级调控网络。

综上,我们对胡桃楸雌雄花芽 miRNAs 测序的研究,有助于进一步对胡桃楸性别分化 miRNA 进行鉴定,为揭示雌雄异型异熟胡桃楸性别分化 机制,该研究有助于揭示 提供理论支撑。

参 考 文 献

- Ahsan, M. U. and A. Hayward, et al. (2019). "Juvenility and Vegetative Phase Transition in Tropical/Subtropical Tree Crops." *FRONTIERS IN PLANT SCIENCE* 10.
- Bai, P. and H. Lin, et al. (2022). "Temporal Dynamic Transcriptome Landscape Reveals Regulatory Network During the Early Differentiation of Female Strobilus Buds in *Ginkgo biloba*." *FRONTIERS IN PLANT SCIENCE* 13.
- C, P. K. and L. Matthias, et al. (2017). "An Evolutionary Framework for Carpel Developmental Control Genes." *Molecular biology and evolution* 34 (2).
- Cao, G. X. and R. T. Li, et al. (2020). "Gender specialization and factors affecting fruit set of the wind-pollinated heterodichogamous *Juglans regia*." *Plant Species Biology* 35 (2).
- Chen, X. and X. Mao, et al. (2019). "Morphological Characterization of Flower Buds Development and Related Gene Expression Profiling at Bud Break Stage in Heterodichogamous *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja." *Genes* 10 (10).
- Cheng, Z. and Z. Kailu, et al. (2022). "Identification of miRNAs and Target Genes at Key Stages of Sexual Differentiation in Androdioecious *Osmanthus fragrans*." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (18).
- Dong and Xiangxiang, et al. (2022). "miR390-tasiRNA3-ARF4 pathway is involved in regulating flowering time in woodland strawberry." *Plant Cell Reports*(prepublish).
- Eric, W. and T. Noemi, et al. (2019). "Pollinator Behavior Drives Sexual Specializations in the Hermaphrodite Flowers of a Heterodichogamous Tree." *Frontiers in plant science* 10.
- F, P. J. and A. Edwards, et al. (2003). "Control of leaf morphogenesis by microRNAs." *Nature* 425 (6955).
- F, P. J. and W. Heike, et al. (2019). "Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319." *Developmental cell* 51 (1).
- Fengxi, Y. and L. Chuqiao, et al. (2022). "Organ-Specific Gene Expression Reveals the Role of the Cymbidium ensifolium-miR396/Growth-Regulating Factors Module in Flower Development of the Orchid Plant *Cymbidium ensifolium*." *Frontiers in Plant Science* 12.
- Gubler, F. and R. Kalla, et al. (1995). "Gibberellin-Regulated Expression of a myb Gene in Barley Aleurone Cells: Evidence for Myb Transactivation of a High-pl α -Amylase Gene Promoter." *The Plant Cell* 7 (11).
- Guiliang, T. and R. B. J, et al. (2003). "A biochemical framework for RNA silencing in plants." *Genes & development* 17 (1).

- H, B. S. C. (2002). "The evolution of plant sexual diversity." *Nature reviews. Genetics* 3 (4).
- Han, H. and Z. Yun (2022). "Function and Regulation of microRNA171 in Plant Stem Cell Homeostasis and Developmental Programing." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (5).
- Hu, X. and H. Song, et al. (2023). "Identification and analysis of miRNAs differentially expressed in male and female *Trichosanthes kirilowii* maxim." *BMC GENOMICS* 24 (1).
- Hu, Z. W. and X. P. Shen, et al. (2019). "Evolution of MIR159/319 genes in *Brassica campestris* and their function in pollen development." *PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 101 (6): 537-550.
- J, A. M. and M. B. C (2018). "Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data." *The Plant cell* 30 (2).
- Jin, Q. and R. Mo, et al. (2022). "Identification and Comparative Analysis of Genes and MicroRNAs Involved in the Floral Transition of the Xinjiang Early-Flowering Walnut (*Juglans regia* L.)." *HORTICULTURAE* 8 (2).
- Jingjing, L. and M. Xia, et al. (2016). "A review on flowering mechanism in heterodichogamous plants." *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)* 40 (01): 147-154.
- Kimura, M. K. and S. Goto, et al. (2012). "Morph-specific mating patterns in a low-density population of a heterodichogamous tree, *Juglans ailantifolia*." *Plant Ecology* 213 (9).
- Kravchik, M. and R. Stav, et al. (2019). "Functional Characterization of microRNA171 Family in Tomato." *Plants* 8 (1).
- Kuhn, A. and B. Runciman, et al. (2019). "Two Auxin Response Elements Fine-Tune PINOID Expression During Gynoecium Development in *Arabidopsis thaliana*." *Biomolecules* 9 (10).
- L, F. D. and B. S. C. H (2012). "Disassortative mating and the maintenance of sexual polymorphism in painted maple." *Molecular ecology* 21 (15).
- L, F. D. and B. S. C. H (2012). "Disassortative mating and the maintenance of sexual polymorphism in painted maple." *Molecular ecology* 21 (15).
- Levi, Y. and M. Johannes, et al. (2010). "Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2." *The Plant cell* 22 (7).
- Li, X. and F. Jin, et al. (2015). "Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of flowering in *Cymbidium ensifolium*." *BMC genomics* 16 (1).
- Lijie, Z. and G. Chong, et al. (2021). "Flower Development of Heterodichogamous *Juglans mandshurica* (Juglandaceae)." *Frontiers in Plant Science* 12.
- Liu, B. and G. Li, et al. (2023). "Species-specific regulatory pathways of small RNAs play sophisticated roles in flower development in *Dimocarpus longan* Lour." *Horticultural Plant Journal* 9 (2): 237-249.
- Liu, L. and C. Liu, et al. (2017). "FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport." *PLoS Biology* 10 (4).
- Martin, J. J. J. and A. Asif, et al. (2020). "Characterizing the Role of the miR156-SPL Network in Plant Development and Stress Response." *Plants* 9 (9).
- Matías, B. and D. J. Manuel, et al. (2021). "ARF2 represses expression of plant GRF transcription factors in a complementary mechanism to microRNA miR396." *Plant Physiology* 185 (4).
- Mehrpooyan, F. and R. Y. Othman, et al. (2012). "Tissue and temporal expression of miR172 paralogs and the AP2-like target in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." *TREE GENETICS & GENOMES* 8 (6): 1331-1343.
- Peng, G. and B. Xi, et al. (2010). "Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance." *Planta* 231 (5).
- PÉREZ-QUINTERO, Á. and C. LÓPEZ (2013). "Identification of cisregulatory Elements and Bioinformatic Prediction of Transcriptional Factors Involved in Regulation of miRNAs in Plants." *Acta Biológica Colombiana* 18 (1): 107-120.
- Rubio-Somoza, I. and D. Weigel (2013). "Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three microRNAs." *PLoS Genetics* 9 (3).
- S, A. R. and L. Junyan, et al. (2010). "MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects." *Silence* 1 (1).
- Selinge, B. and T. Yunyun, et al. (2020). "Genome-wide identification of microRNAs involved in the regulation of fruit ripening and climacteric stages in melon (*Cucumis melo*)." *Horticulture research* 7 (1).
- Shibata, M. and S. Kikuchi, et al. (2009). "Effects of population density, sex morph, and tree size on reproduction in a heterodichogamous maple, *Acer mono*, in a temperate forest of Japan." *Ecological Research* 24 (1).
- Shuangrong, Y. and L. Zhigang, et al. (2020). "MiR396 is involved in plant response to vernalization and flower development in *Agrostis stolonifera*." *Horticulture Research* 7 (1).
- Su, Z. and N. Wang, et al. (2020). "Regulation of Female Germline Specification via Small RNA Mobility in *Arabidopsis*."
- T, C. J. and F. Noah, et al. (2011). "Evolution and functional diversification of MIRNA genes." *The Plant cell* 23 (2).
- Tatsundo, F. and T. Shin-ichiro (2014). "Inflorescence dimorphism, heterodichogamy and thrips pollination in *Platycarya strobilacea*

- (Juglandaceae)." *Annals of botany* 113 (3).
- Waheed, S. and L. Zeng (2020). "The Critical Role of miRNAs in Regulation of Flowering Time and Flower Development." *GENES* 11 (3).
- Wang, X. and Y. Zheng, et al. (2019). "Discovery and Profiling of microRNAs at the Critical Period of Sex Differentiation in *Xanthoceras sorbifolium* Bunge." *Forests* 10 (12).
- Yan, Z. and Z. Xiaolan, et al. (2014). "A GAMYB homologue CsGAMYB1 regulates sex expression of cucumber via an ethylene-independent pathway." *Journal of experimental botany* 65 (12).
- Yingting, Z. and Y. Junjie, et al. (2021). "Identification of microRNAs and their target genes related to needle discoloration of evergreen tree Chinese cedar (*Cryptomeria fortunei*) in cold winters." *Planta* 254 (2).
- Yujun, S. and X. Xinguo, et al. (2021). "Integrated Analysis of Small RNA, Transcriptome, and Degradome Sequencing Reveals the MiR156, MiR5488 and MiR399 Are Involved in the Regulation of Male Sterility in PTGMS Rice." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5).
- Yurong, X. and L. Yang, et al. (2020). "Arabidopsis FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching." *Nature communications* 11 (1).
- Zhou, L. and S. Quan, et al. (2018). "Identification and Expression of miRNAs Related to Female Flower Induction in Walnut (*Juglans regia* L.)." *Molecules* 23 (5).
- Zihan, X. and L. Qian, et al. (2022). "miR390 family of *Cymbidium goeringii* is involved in the development of reproductive organs in transgenic Arabidopsis." *BMC plant biology* 22 (1).
- 蔡佳友与秦柏婷等 (2022). "胡桃楸花芽性别分化激素调控相关 SAUR 基因克隆与表达分析." *分子植物育种*: 1-8.
- (Jiayou, C. and Q. Baiting, et al. (2022). "Hormone Regulation of Flower Bud Sex Differentiation of *Juglans mandshurica* Cloning and Expression Analysis of Related SAUR Genes." *Molecular Plant Breeding*: 1-8.)
- 胡帅与肖文君等 (2014). "成花素 FT 的调控运输及生理功能的研究进展." *生命科学研究* 18 (06): 527-532+549.
- (Shuai, H. and Z. Wen-jun, et al. (2014). "Progresses on Regulation, Transportation and Physiological Function of Florigen Flowering Locus T." *Life Science Research* 18 (06): 527-532+549.)
- 黄鹏与毛霞等 (2018). "雌雄异型异熟青钱柳花发育过程中养分的动态变化." *南京林业大学学报(自然科学版)* 42 (05): 1-9.
- (Peng, H. and M. Xia, et al. (2018). "Dynamic changes of nutrients during flora development in heterodichogamous *Cyclocarya paliurus*." *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)* 42 (05): 1-9.)
- 亢超 (2022). 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, 石河子大学.
- (Chao, K. (2022). Identification of miR164 and its target NAC family genes and expression analysis of related genes during flower formation in Walnut)
- 王东娜与牟长城等 (2011). "胡桃楸天然种群遗传多样性的 ISSR 分析." *经济林研究* 29 (02): 22-29.
- (Dongna, W. and M. Changcheng, et al. (2011). "ISSR analysis of genetic diversity of *Juglans mandshurica* Maxim populations." *Nonwood Forest Research* 29 (02): 22-29.)
- 谢洁与王明等 (2018). "植物 miR390 的研究进展." *生物技术通报* 34 (06): 1-10.
- (Jie, X. and W. Ming, et al. (2018). "Research Progress on Plant miR390." *BIOTECHNOLOGY BULLETIN* 34 (06): 1-10.)
- 张丽杰与果冲等 (2019). "胡桃楸开花物候特性及花粉生活力." *东北林业大学学报* 47 (05): 4-8.
- (Lijie, Z. and G. Chong, et al. (2019). "Phenological Characteristics of Flowering and Pollen Viability of *Juglans mandshurica*." *Journal of Northeast Forestry University* 47 (05): 4-8.)
- 张昱与张莉等 "miR156-SPL 分子模块调控植物生长发育." *分子植物育种*: 1-22.
- (Yu, Z. and Z. Li, et al. "miR156-SPL Molecular Module Regulates Plant Growth and Development." *Molecular Plant Breeding*: 1-22.)
- 朱早兵与虞夏清等 (2019). "黄瓜 microRNA171 的克隆与功能分析." *园艺学报* 46 (05): 864-876.
- (Zao-bing, X. and Y. Xia-qing, et al. (2019). "Cloning and Functional Analysis of microRNA171 in Cucumber." *Acta Horticulturae Sinica* 46 (05): 864-876.)