

miRNA 响应蓝光调控杨树生长的分子机制

任亚超^{1,2}, 张益文^{1,2}, 李红燕^{1,2}, 冯泽军^{1,2}, 张军^{1,2}, 王进茂^{1,2}, 杨敏生^{1,2*}

(1. 河北农业大学林学院 保定 071000; 2. 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室 保定 071000)

摘 要: 探明 miRNA 响应蓝光调控杨树生长的分子机制。以 741 杨盆栽苗为材料, 进行 LED 蓝光和白光处理, 以白光为对照, 测定蓝光诱导植株的生长及生理指标, 以明确其生长差异; 通过 miRNA-seq、qRT-PCR 结合前期 RNA-seq, 分析 miRNA 及其靶基因的表达量变化及功能; 以 miR166o 为对象, 借助转基因、基因编辑、RNA-seq、DAP-seq 等手段, 探究 miR166o 功能及其下游调控路径。LED 蓝光和白光处理 741 杨盆栽苗 1d、2d 和 5d 后, 蓝光组的株高显著高于白光组, 处理 2d 和 5d 时, 蓝光组的 *Pn*、叶片内源性激素 IAA、GA₃、CTK 显著高于白光组; 以蓝光和白光处理 1d 的叶片为材料进行 miRNA-seq, 共筛选到 19 个差异表达 miRNAs, 预测到 150 个 miRNA 的靶基因, 在环境信息过程中主要富集到信号转导通路; 4 个关键差异表达 miRNA *ptc-miR166*、*ptc-miR167*、*ptc-miR396* 和 *ptc-miR319* 的靶基因大多数为生长素反应因子 *ARF*、生长调节因子 *GRF* 及 *MYB*、*TCP*、*SPL* 和 *HD-ZIP* 转录因子家族基因, 差异表达 miRNA 受蓝光诱导后表达水平降低, 靶基因的表达模式相反; 获得了 miR166o 前体过表达 (OE) 株系和 CRISPR/Cas9 基因编辑 (DE) 株系各 9 个; DE 株系中 miR166o 不表达或表达量极低, 靶基因 *HB14* 表达量显著增加, 而 OE 株系相反, 双荧光素酶报告基因实验证明 miR166o 与 *HB14* 存在靶向作用关系; 前期生长过程中 DE 株系的株高、地径、节间数量和叶面积显著高于 WT 和 OE 株系; 6 月龄时, DE 株系的 IAA 含量高于 WT, GA 含量显著高于 WT, OE 株系的 ABA 含量显著高于 WT 和 DE 株系; DE 株系茎的硬度较高, 木质部宽度、韧皮部宽度、形成层细胞层数、平均纤维长度和宽度、纤维素、半纤维素和木质素含量均显著高于 WT 和 OE 株系; RNA-seq 发现 DE-vs-WT 中, 黄酮类化合物的生物合成、次生代谢物的生物合成、卟啉代谢、植物激素信号转导途径等富集较为显著; 基于 DAP-seq 鉴定到 *HB14* 调控的靶基因包括 *ARF9*、*ARF2*、*ARF-BP1*、*GID1B*、*GID1C*、*GA20ox1*、*ERF091*、*PIN-LIKES2* 等植物激素信号转导、合成及光响应相关基因。本研究明确了蓝光诱导可促进 741 杨盆栽苗生长, 挖掘出关键差异表达 miRNA 及其靶基因, 明确了 miR166o 敲除可促进杨树生长, miR166o 靶向 *HB14* 调控下游靶基因参与植物激素信号转导等通路进而调控杨树生长, 为光控植物生长研究及杨树分子育种提供理论依据和种质资源。