

基于 microRNA 深度测序的猕猴桃性别分化初探

闫明科^{1,2}, 徐 强³, 刘春燕¹, 张 琼¹, 姚小洪^{1,*}

(¹ 中国科学院武汉植物园, 中国科学院种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074; ² 中国科学院大学, 北京 100049; ³ 上饶职业技术学院, 江西上饶 334109)

摘 要: 利用新一代高通量测序技术, 对猕猴桃雌花和雄花中表达的小 RNA 进行了测序, 分别得到雌花 18 408 610 条序列和雄花 11 191 469 条序列。通过生物信息学分析, 共鉴定和预测得到 39 个保守 miRNA 家族和 400 个新的 miRNA 家族, 其中有 170 个 miRNA 家族在雌、雄花样品间显著差异表达。对差异表达 miRNA 进行靶基因的预测及注释, 结果显示, 靶基因产物具有包含核苷三磷酸水解酶的磷酸环结构域的 miRNA 数量最多。在猕猴桃 25 号连锁群 (Chr25) 上共预测得到 3 个 miRNA, 其中 novel-ach-miR362 的靶基因 Achn298021 可能与猕猴桃花的性别发育有关。

关键词: 猕猴桃; microRNA; 深度测序; 性别分化

中图分类号: S 663.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 07-1260-13

Preliminary Investigation on Sex Differentiation of *Actinidia chinensis* by High-throughput microRNAs Sequencing

YAN Ming-ke^{1,2}, XU Qiang³, LIU Chun-yan¹, ZHANG Qiong¹, and YAO Xiao-hong^{1,*}

(¹Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Shangrao Vocational & Technical College, Shangrao, Jiangxi 334109, China)

Abstract: The miRNAs in female and male flowers of kiwifruit were sequenced by next-generation sequencing, and received 18 408 610 and 11 191 469 reads, respectively. Using bioinformatics methods, 39 conserved and 400 novel miRNA families including 170 miRNA families that were differently expressed between the two samples were identified. Targets prediction and annotation of identified miRNAs revealed the most enrichment of P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase domain in InterPro terms. Three miRNAs were predicted to be located on the kiwifruit sex chromosome (Chr25), among which, target gene Achn298021 of novel-ach-miR362 was predicted to be related to flower development, and should be drawn special attention in future study.

Key words: kiwifruit; microRNA; high-throughput sequencing; sex determination

猕猴桃是功能性雌雄异株植物, 其花芽在发育初期是双性的, 但在发育过程中雌、雄株各所对应的另一种性别的花器官败育, 形成单性植株: 雌株的雄蕊败育不产生有生活力的花粉, 而雄株的雌蕊败育不形成胚珠 (Ferguson, 1984)。由于猕猴桃雌、雄株的幼苗外形相似, 对其性别分化的分

收稿日期: 2015-03-06; 修回日期: 2015-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370251)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yaox@wbcas.cn)

子机理进行研究, 有助于在植株发育早期鉴定性别, 节省土地和人力物力, 提高种植效益。

性二态性是植物生活史中后期发育阶段决定的性状, 主要局限于花器官发生和生殖器官分化之时 (Vyskot et al., 2001)。不同植物的性别分化可能受多种不同因素影响 (Tanurdzic & Banks, 2004; 胡冬南 等, 2013; Aryal & Ming, 2014; Zhang et al., 2014), 而这些因素的作用结果最终在被子植物中表现在以花为主的生殖器官表型上 (Charlesworth, 2013)。初始两性花中的一种性器官的发育受抑制, 其细胞进入程序化细胞死亡从而使该种性别特征逐渐消失 (Wu & Cheung, 2000)。因此, 一系列参与植物花器官发育的基因都可能与植物的性别分化有关。对植物花发育相关基因 (主要是 ABC 模型基因) 的研究证实了这一观点 (Vyskot et al., 2001)。然而, 当人们试图将 ABC 模型 (或改进的 ABCDE 模型) 基因与植物性染色体直接联系起来时却出现了困难: 花器官决定基因更多的是分散于常染色体上 (Hardenack et al., 1994; Matsunaga & Kawano, 2001; Vyskot et al., 2001; Matsunaga et al., 2004)。因此, 可进一步推测这些花发育相关基因是受上游转录因子、调控元件及多种表观遗传因子 (包括小 RNA) 等的调控, 而这些调控基因或与其相关联的基因很可能就位于植物性染色体或性别决定位点处。不过, 目前尚未有经过试验验证的雌雄异株植物性别决定基因的报道。对猕猴桃杂交后代群体的遗传学分析认为, 猕猴桃的性别分化符合 XY 型性染色体性别决定系统 (McNeilage, 1995); 进一步的核型观察 (Huang et al., 2002) 和多基因连锁图谱的构建 (Fraser et al., 2009), 发现中华猕猴桃 XY 染色体在长度和外观形态上是相似的, 但 Y 染色体上的亚端粒部位存在不能与 X 染色体自由重组的性别决定位点, 并由此推断猕猴桃性染色体尚处于进化的早期阶段 (可能是第二到第三阶段, Ming et al., 2011)。已有研究表明, 在猕猴桃雄性不育和可育植株中同时存在多个控制花器官决定的基因 (Varkonyi-Gasic et al., 2011), 但在雄性不育植株的早期小孢子阶段这些基因受到了涉及程序性细胞死亡的抑制作用, 致使花药发育异常 (Coimbra et al., 2004)。因此, 可以通过研究不同性别猕猴桃花中差异表达的基因及其调控网络来分析其性别决定的机理。

植物体中的微 RNA (microRNA, miRNA) 长约 21 nt, 通过转录后基因调控的方式参与调节多种植物发育和内外应答反应, 其中即包括花器官发育和花的性别分化 (Luo et al., 2013; Taylor et al., 2014)。目前, 运用 miRNA 研究基因功能已应用于多种植物之中, 并且取得了一系列重要进展 (Zhou & Luo, 2013; Taylor et al., 2014)。玉米中存在一类 *ts4* 基因, 其编码的 *zma-miR172e* 作用于同源异型转录因子 *APETALA2*, *ts4* 突变株的雄穗发育异常 (Chuck et al., 2007)。将新一代高通量测序技术运用于植物 miRNA 分析, 鉴定了一批在木瓜和杨树中性别差异表达的 miRNA (Song et al., 2013; Aryal et al., 2014), 以及其他植物中参与花器官分化、发育的 miRNA (Gao et al., 2012; Wang et al., 2012; Jiang et al., 2014)。对于猕猴桃的研究表明, miR172 以一种进化上保守的方式作用于一类 A 类花器官同源异型基因 *AP2* 并控制其表达, 缺少 miR172 作用时将导致花发育异常 (Varkonyi-Gasic et al., 2012)。但目前尚没有对于猕猴桃雌、雄花中 miRNA 整体表达谱的研究报道。

本研究中利用第二代高通量测序技术对猕猴桃雌、雄花中表达的小 RNA (sRNA) 进行了测序, 运用生物信息学分析, 鉴定了其中进化上保守的 miRNA, 预测了雌、雄花特异的新 miRNA; 筛选了一批差异表达的 miRNA 并预测了靶基因, 为从遗传学角度研究猕猴桃雌、雄株的性别分化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

由于猕猴桃全基因组序列信息来源于中华猕猴桃品种 ‘红阳’ (雌株), 为尽量消除遗传背景差

异并兼顾与基因组数据的吻合性,选用的雌株为‘红阳’,雄株为‘红阳’开放性授粉所获得的子代雄株。供试植株材料均来源于中国科学院武汉植物园国家猕猴桃种质资源圃。于2013年4月1日取花蕾期(未开放)的全花,取材后立即置于液氮中并转移至-70℃保存备用。

1.2 RNA提取、文库构建与测序

取100 mg组织样本经液氮研磨成粉末后,用Trizol(Invitrogen)法抽提得到总RNA。总RNA经15%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,参照TrackIt™ 10 bp DNA Ladder(Invitrogen)在胶中所处的位置,切胶回收并纯化15~40 nt范围内的RNA,得到sRNA。sRNA文库参照Truseq™ Small RNA Sample Preparation Kit(Illumina)的说明进行。得到的sRNA cDNA文库用TruSeq PE Cluster Kit(Illumina)进行扩增,最后利用Illumina Hiseq 2000平台进行测序。

原始序列经Cutadapt(version 1.3)去接头、Fastx_toolkit(version 0.0.14)过滤低质量、包含N和polyA的序列后,余下18~30 nt的干净序列使用bowtie(version 1.0.0)比对到猕猴桃基因组(Huang et al., 2013)并去除未匹配序列。比对到基因组的序列又进一步比对到Rfam和NCBI中的相关ncRNA,以去除snRNA、snoRNA、scRNA、rRNA和tRNA,比对到Rebase中的植物序列以去除重复元件。余下序列进入后续miRNA的鉴定和预测。

保守miRNA的鉴定是运用Blastn(version 2.2.29+)比对到miRBase(Release 20)完成的,比对要求完全匹配(只保留至少在1个样品中序列数不少于5的序列)。新miRNA(novel miRNA)预测使用mireap进行,仍然舍弃在两个样品中表达量都小于5的序列,预测结果使用cd-hit利用序列相似性聚类成家族。保守和新miRNA通过TPM(每百万条序列中目标miRNA序列数)校准后(校准到干净序列总数后,如果两个样品中某个miRNA的表达量为0,则修改为0.01;如果两个样品中某个miRNA的表达量都小于1,由于其表达量过低,不参与差异表达分析),利用IDE6完成差异表达分析, p 值(样品间差异由抽样误差所致的概率)通过Audic和Claverie途径(Audic & Claverie, 1997)计算得到。本研究选取了在两个样品间显著差异表达(log2 fold-change 大于1或小于-1, p 值小于0.05)的miRNA,使用psRNATarget进行了靶基因的预测(默认参数)。预测得到的靶基因基于猕猴桃基因组的注释数据进行了注释,统计了根据InterPro中超家族、家族和结构域的结构和功能预测、分类,并进一步通过InterPro中的interpro2go转化为GO注释,使用WEGO进行了GO术语的富集分析。

1.3 miRNA表达的qRT-PCR定量验证

为了验证使用深度测序技术分析miRNA表达的可靠性,随机选取11个显著差异表达的miRNA(MIR160、MIR169_1、MIR172、MIR394、MIR397、MIR827_4、MIR1509、novel-ach-miR18、novel-ach-miR40、novel-ach-miR123和novel-ach-miR267)进行qRT-PCR的定量验证。

猕猴桃雌、雄花花蕾经-70℃保存直至RNA提取。总RNA使用EASYspin Plus植物RNA快速提取试剂盒(艾德莱生物)提取获得,并直接用于miRNA的逆转录。逆转录使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)(TaKaRa)进行,使用的stem-loop引物根据Chen等(2005)的报道设计合成;将引物混合后按Tang等(2006)介绍的混合逆转录法进行温度设置。

逆转录产物经稀释10倍后,使用SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(TaKaRa)进行荧光定量检测。试验操作按照试剂盒说明书进行,最后使用ABI 7500 Fast Real-Time PCR System进行荧光定量,采用两步法PCR进行温度设置:95℃ 30 s, 1个循环;95℃ 3 s, 62℃ 30 s, 40个循环。每个miRNA都设计至少3个生物学重复及3个技术重复,并同时使用经测试在猕猴桃花

发育不同时期相对较稳定表达的 5.8S 和 U6 作为内参进行校准。所得数据使用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行了 miRNA 表达的相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果统计

因为猕猴桃花的性别分化在花发育早期就已决定 (Brundell, 1975; Polito & Grant, 1984; White, 1990; Scoccianti et al., 1999; Vyskot et al., 2001; Coimbra et al., 2004; 杨妙贤 等, 2011; Falasca et al., 2013), 故为研究其雌、雄花中的 miRNA 表达情况, 选取了中华猕猴桃品种 ‘红阳’ (雌株) 及其子代雄株的花蕾全花提取分离 miRNA 进行了测序。测序分别得到 18 408 610 (雌花, F) 和 11 191 469 (雄花, M) 条序列。原始序列经去接头、质量控制后, 雌、雄样品分别得到 10 808 482 和 10 052 964 条长度为 18 ~ 30 nt 的干净序列。对这些干净序列的长度进行统计, 结果显示大部分序列分布于 21 ~ 24 nt 之间, 其中长度为 24 nt 的序列占比最多, 21 nt 次之 (图 1), 这与其他众多植物中的测序结果 (Zhao et al., 2010; Khraiwesh et al., 2013; Aryal et al., 2014) 类似。从样品间分析可以发现, 雌花中的 sRNA 在 21 ~ 24 nt 间的集中度更为明显, 占样本 sRNA 总数的 84.93%, 特别是数量最多的 24 nt 和 21 nt 长度的序列, 占到了 70.04%; 而雄花中的 sRNA 分布则相对更为均匀, 分别为 67.86% (21 ~ 24 nt) 和 54.14% (21 nt + 24 nt)。将干净序列比对到猕猴桃基因组序列, 分别有 8 496 009 (78.61%) 和 7 748 498 (77.08%) 条完全匹配结果。进一步比对到 Rfam 和 NCBI 的相关序列以去除 snRNA、snoRNA、scRNA、rRNA 和 tRNA, 比对到 Repbase 去除重复元件后, 余下 8 481 708 和 7 721 618 条序列 (表 1), 分别代表 2 088 976 和 1 362 085 条单一序列 (非冗余) 进入后续 miRNA 的鉴定和预测分析。

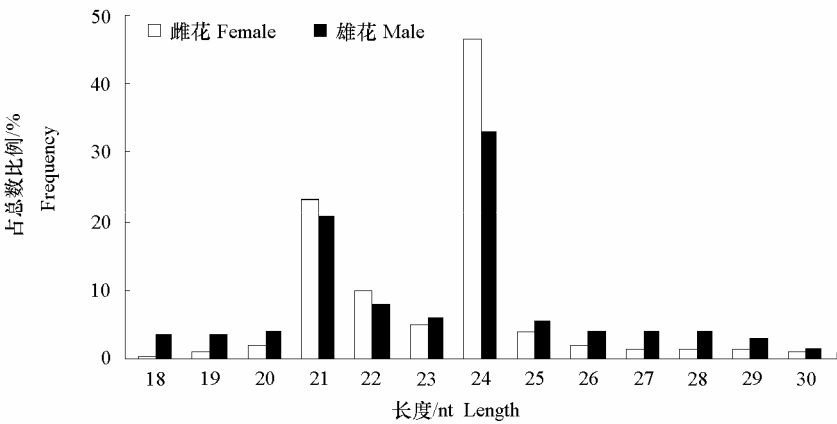


图 1 猕猴桃雌花和雄花 sRNA 长度分布

Fig. 1 Length distribution of sRNA of female and male flowers of kiwifruit

表 1 测序数据处理统计

Table 1 Statistical analysis of sequencing reads for the two sRNAs libraries

样品 Sample	原始序列 Raw reads	干净序列 Clean reads	比对到参考 基因组序列 Mapped to genome	比对到 snRNA 等的序列 Mapped to other ncRNAs	比对到 Repbase 的序列 Mapped to Repbase	候选 miRNA 总序列 Candidate miRNA total reads	候选 miRNA 单一序列 Candidate miRNA unique reads
雌花 Female	18 408 610	10 808 482	8 496 009	11 862	2 439	8 481 708	2 088 976
雄花 Male	11 191 469	10 052 964	7 748 498	20 479	6 401	7 721 618	1 362 085

2.2 保守 miRNA 鉴定

通过与 miRBase 数据库进行比对, 雌花样品有 953 条单一序列得到精确匹配结果, 涉及到 39 个保守 miRNA 家族; 雄花样品则有 1 040 条匹配序列共 37 个保守 miRNA 家族。在鉴定得到的保守 miRNA 家族中, 有 37 个家族是雌雄共有的, 有两个家族 (MIR827_4 和 MIR827_5) 为雌花特有。

2.3 新 miRNA 预测与分析

对于在 miRBase 中没有精确匹配结果的 sRNA 序列, 采用 mireap 软件比对到猕猴桃参考基因组, 以预测和发掘猕猴桃 (花) 中特异表达的 miRNA。将预测结果进行整理分析, 在雌、雄花中分别预测得到 293 和 187 条新的 miRNA 序列; 其中, 有 80 条新 miRNA 为雌、雄花共有, 213 条为雌花特有, 而 107 条为雄花特有。

2.4 miRNA 差异表达分析

对雌、雄花样品间差异表达的 miRNA 进行了分析。设定变化倍数大于 2 倍, 且 p 值小于 0.05 的标准作为显著差异表达的认定依据。从总共 439 个 miRNA 家族 (保守 39 个, 新的 400 个) 中鉴定得到 170 个显著差异表达的 miRNA 家族。其中, 相对于雌花样品, 雄花样品中的保守 miRNA 家族有 6 个上调表达和 7 个下调表达, 而新 miRNA 家族则有 43 个上调表达和 114 个下调表达 (表 2)。

表 2 猕猴桃雌、雄花显著差异表达 miRNA 家族
Table 2 Significantly differently expressed miRNA families of male and female flowers

miRNA 家族 miRNA family	序列 Sequence	校准后序列数 Normalized count		Log2(M/F)	p	表达模式 Expression mode
		F	M			
MIR160	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	2.50	6.47	1.37	3.00E-06	上调 Up
MIR169_1	TAGCCAAGAATGACTTGCCTG	0.65	2.09	1.69	1.26E-03	上调 Up
MIR172	AGAATCTTGATGATGCTGCAG	1.76	0.60	-1.56	4.01E-03	下调 Down
MIR394	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	1.67	12.43	2.90	0	上调 Up
MIR397	TCATTGAGTGCAGCGTTGATG	2.50	1.19	-1.07	5.75E-03	下调 Down
MIR398_2	TGTGTTCTCAGGTCGCCCC	0.19	1.39	2.91	5.65E-04	上调 Up
MIR529	TTGACAGAAGAGAGAGAGCAC	2.78	0.10	-4.80	0	下调 Down
MIR827	TTAGATGACCATCAGCAAACA	3.24	0.70	-2.22	8.00E-06	下调 Down
MIR827_4	TTTGTGTGATGGTCATCTAATC	1.11	0.01	-6.79	1.80E-04	下调 Down
MIR827_5	TTTTGTGTGATGGTCATCTAATC	1.11	0.01	-6.79	1.80E-04	下调 Down
MIR1509	TTATACAGAGAAATCACGGTCG	59.12	26.26	-1.17	0	下调 Down
MIR3630	TTGGGAATCTCTCTGATGCAT	2.78	7.36	1.41	1.00E-06	上调 Up
MIR4376	TACGCAGGAGAGATGATGCTG	1.57	4.68	1.57	1.20E-05	上调 Up
novel-ach-miR3	ATGCATTGATGGTTCTGAGCAAT	3.61	1.19	-1.60	8.70E-05	下调 Down
novel-ach-miR10	CAACCGCGAAACGTCGACCCG	44.59	16.51	-1.43	0	下调 Down
novel-ach-miR15	TTAAGGATTGCTGCCGTGTGTA	5.37	0.60	-3.17	0	下调 Down
novel-ach-miR18	GAGCGATTGTCTGGTTAATTC	6.29	28.75	2.19	0	上调 Up
novel-ach-miR19	CAAAATCCAGAGATCGCACTTT	3.98	1.39	-1.51	7.10E-05	下调 Down
novel-ach-miR21	TTCTTAGGCTAGTCGAATTGA	2.31	1.09	-1.08	6.83E-03	下调 Down
novel-ach-miR22	CGGGCATCATCTTGGCTTGCC	0.74	2.09	1.50	2.36E-03	上调 Up
novel-ach-miR24	TTGTCGTAGGAGAGATGGCACC	3.52	13.73	1.97	0	上调 Up
novel-ach-miR25	TTGGTACTGCATACATTGGTG	6.11	1.69	-1.85	0	下调 Down
novel-ach-miR29	TAGAATACGGAATGAAAACGCC	1.30	0.50	-1.38	1.46E-02	下调 Down
novel-ach-miR30	TCTGATACCAATTGTTGTCCT	2.78	1.29	-1.10	3.61E-03	下调 Down
novel-ach-miR32	CAACTCCTTGTGGAATCGACCT	1.57	0.70	-1.18	1.41E-02	下调 Down
novel-ach-miR34	ATGAAGTCTTGTTCAACTGCCT	7.59	1.39	-2.45	0	下调 Down
novel-ach-miR39	TTTGAATCTCTGATGGGCGAT	24.06	5.77	-2.06	0	下调 Down
novel-ach-miR40	TTAAATGAAAATCTTTGGGAT	20.91	4.58	-2.19	0	下调 Down
novel-ach-miR44	GTGTTTCTATCGTTGTCATA	1.11	0.20	-2.48	3.81E-03	下调 Down
novel-ach-miR45	TCCATGATCCAAATACAGCCT	1.02	0.40	-1.35	2.56E-02	下调 Down
novel-ach-miR47	TTTGGTGAGGGAAAAGGGAAA	9.81	3.58	-1.45	0	下调 Down
novel-ach-miR53	ATTGACAGACTGAGAGCTCTT	17.12	41.28	1.27	0	上调 Up
novel-ach-miR55	CTTTCGTTCTTGATTAATGAA	0.74	1.99	1.43	3.55E-03	上调 Up
novel-ach-miR56	TCGGATCTCTGAAGTGCGCC	1.67	0.80	-1.07	1.58E-02	下调 Down
novel-ach-miR57	TGCTGGTATGATCGCACCCGA	7.12	3.08	-1.21	8.00E-06	下调 Down

续表 2

miRNA 家族 miRNA family	序列 Sequence	校准后序列数 Normalized count		Log2(M/F)	p	表达模式 Expression mode
		F	M			
novel-ach-miR58	ATGGATCCGGAACGCCGAGAA	2.04	0.60	- 1.77	1.19E-03	下调 Down
novel-ach-miR60	TAGTGGATGTAGCAACGAGAA	126.66	48.74	- 1.38	0	下调 Down
novel-ach-miR61	TTTGGCTGGCGGATATGAGAG	2.31	0.80	- 1.54	1.41E-03	下调 Down
novel-ach-miR62	TCACAAAATAAGTAGGACCCG	3.79	0.40	- 3.25	0	下调 Down
novel-ach-miR65	CCACTGCCCTCCTCGTCAAGCG	0.46	1.99	2.10	4.36E-04	上调 Up
novel-ach-miR66	TTGCACACGCACCTGAATCGG	2.78	6.76	1.29	5.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR71	TTTGATCTCTGATTCATGCCT	1.02	0.50	- 1.03	3.95E-02	下调 Down
novel-ach-miR73	TTGAATTCTGTGAACCTTTTCT	1.11	0.30	- 1.90	9.18E-03	下调 Down
novel-ach-miR76	ATGGTGAGGCTTTGGGAAGAA	1.57	0.70	- 1.18	1.41E-02	下调 Down
novel-ach-miR77	ATTCTCTGTATGCTTCATCC	0.74	2.88	1.96	6.20E-05	上调 Up
novel-ach-miR78	TTTAGGATTCGTTGGGTTGAG	7.22	0.50	- 3.86	0	下调 Down
novel-ach-miR83	AAATCCTTTGACTTCGTCGTGAGT	0.01	4.28	8.74	0	上调 Up
novel-ach-miR84	TTGTCGAGTATTAGGAATGGAGCC	0.01	17.31	10.76	0	上调 Up
novel-ach-miR96	TTCGGGTATGAACCTGGGCTGACC	0.01	4.38	8.77	0	上调 Up
novel-ach-miR103	ATTCGTTGTGCGGACTACTTGGCC	0.01	4.28	8.74	0	上调 Up
novel-ach-miR106	GGGATATGATGATAGTCGTTGTC	0.01	1.59	7.31	4.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR110	TTGCCATTAAGGACTCCTCTAG	0.01	1.29	7.01	3.60E-05	上调 Up
novel-ach-miR112	CTAATGAGTATCAGTTGGGCCT	0.01	5.37	9.07	0	上调 Up
novel-ach-miR113	CAAGAATGGGGGCTGTATGAGC	0.01	1.09	6.77	1.57E-04	上调 Up
novel-ach-miR115	TTGTGACTAGATGCCCGAGGAA	0.01	2.19	7.77	0	上调 Up
novel-ach-miR118	CTTGGGCCGAGCTGGATGGACC	0.01	1.09	6.77	1.57E-04	上调 Up
novel-ach-miR120	TTCCGTAATCCGCGTGTGTGGC	0.01	1.59	7.31	4.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR121	AAAGGCTAAGGAGACAAGTGAG	0.01	1.29	7.01	3.60E-05	上调 Up
novel-ach-miR123	TTTGGCTGGAGGATATGGGAAG	0.01	3.88	8.60	0	上调 Up
novel-ach-miR128	TTAGGACACAAGCACTTCGGGG	0.01	3.98	8.64	0	上调 Up
novel-ach-miR132	TGAAAACGAAGTGGTCTGACTT	0.01	11.24	10.13	0	上调 Up
novel-ach-miR134	ATTCTTTGATTTTCTTTGACTT	0.01	3.98	8.64	0	上调 Up
novel-ach-miR138	ACATTCTTTATGATCTTCTAAC	0.01	1.49	7.22	8.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR141	TTGAGGCGGAGCATGGCGAGGA	0.01	6.86	9.42	0	上调 Up
novel-ach-miR146	TGTAGGTCGACCTTTATGTTCC	0.01	1.29	7.01	3.60E-05	上调 Up
novel-ach-miR148	TACGGTGATACATCGACTTGGTC	0.01	1.39	7.12	1.80E-05	上调 Up
novel-ach-miR151	ATCTGGACCATTCAATTTTGAA	0.01	2.59	8.01	0	上调 Up
novel-ach-miR154	ATCTTAGAGTATGGAGCGCCT	0.01	1.19	6.90	7.60E-05	上调 Up
novel-ach-miR156	TCTGGACCATTCAATTAATAAA	0.01	1.79	7.48	1.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR157	AATAAGTGAGATCCGTCCTAA	0.01	3.28	8.36	0	上调 Up
novel-ach-miR158	ACTTGGCATGACCGTTGGGCA	0.01	2.19	7.77	0	上调 Up
novel-ach-miR160	TGCATTTGCACCTGCACCTGA	0.01	2.69	8.07	0	上调 Up
novel-ach-miR161	AATTTGGTCAATGAAAGGGGC	0.01	1.49	7.22	8.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR162	TCACAATTGAATACGGGCTCC	0.01	3.68	8.52	0	上调 Up
novel-ach-miR163	TGCACTCCTGTACTTTCGCCT	0.01	1.79	7.48	1.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR165	CAAAATAAGTGGGACCCGCCT	0.01	2.19	7.77	0	上调 Up
novel-ach-miR168	ACATTGGTTGCTGTGAGGGCC	0.01	3.18	8.31	0	上调 Up
novel-ach-miR169	CCGGGTGTGCTCGTGTGCCC	0.01	1.39	7.12	1.80E-05	上调 Up
novel-ach-miR172	TAGAGATCCGAGGTTTGTGTC	0.01	1.59	7.31	4.00E-06	上调 Up
novel-ach-miR178	TCGACTTGAGAAAATTGGGCC	0.01	1.09	6.77	1.57E-04	上调 Up
novel-ach-miR187	GTGGGGAGTTTGGCTGGGGC	0.01	38.70	11.92	0	上调 Up
novel-ach-miR188	AGCCGGTGATGAGGAATTTTGGGC	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR189	AGAGTTGAGTTTGGGTTTTGAGC	2.50	0.01	- 7.96	0	下调 Down
novel-ach-miR190	AAGAATGGAGGCATGAATGAGCTC	1.94	0.01	- 7.60	0	下调 Down
novel-ach-miR194	ATTGGCTGAATCGATCTCTAAGAT	5.09	0.01	- 8.99	0	下调 Down
novel-ach-miR196	ATTCCATGAAGAACCCTCGGGCA	2.50	0.01	- 7.96	0	下调 Down
novel-ach-miR203	TAACCAAGTGAATCTGAACCAT	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR204	ATTAGTTGACTGGGACAGGGCCT	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR208	AAGGCTCTAACACTCTATGATGT	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR214	TGTGGAATAAAAAATTATCGTT	1.94	0.01	- 7.60	0	下调 Down
novel-ach-miR217	AAAAGAGTTATGCTGACCGGAGG	2.04	0.01	- 7.67	0	下调 Down
novel-ach-miR224	TTGGTGGCCGTTGATTATGTTTC	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR234	TATATGAGGATACGGAGGACAAC	1.48	0.01	- 7.21	1.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR236	GAGACGATCAGGACTGTGGCGCC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR239	TAATGTTAAGACGGGCTCGAGCC	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR240	TTCTGACTTTTAAATTTGGCCC	2.31	0.01	- 7.85	0	下调 Down
novel-ach-miR243	TCCGGCGTGGCGATAGAATCATC	5.18	0.01	- 9.02	0	下调 Down
novel-ach-miR244	TGAATGGTGGACTATATATGGT	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR245	CATCTTCTCTGCTCTGTGGCCT	6.66	0.01	- 9.38	0	下调 Down
novel-ach-miR246	CAGGATAAAATGGCTAGAACC	3.24	0.01	- 8.34	0	下调 Down
novel-ach-miR250	TTTGTGTGTATCATGAGACT	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR251	TTCAATAGTCTAAGTGTAACCT	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down

续表 2

miRNA 家族 miRNA family	序列 Sequence	校准后序列数 Normalized count		Log2(M/F)	p	表达模式 Expression mode
		F	M			
novel-ach-miR252	TTAAGGGTTAGGATTTTGTGTC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR254	CAITCTGCAACGCCCTTGGCAC	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR255	CCAAAATGCTAATCTGAGGCTT	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR256	TGAGGATCTTAGTGTGAAC TAG	3.05	0.01	- 8.25	0	下调 Down
novel-ach-miR257	TACGTGAGAGAGAGATATGAGCC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR263	TTTGGAATATGGATTTTAGGTC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR264	CGTGATATTGGTCTGGGCTCATC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR267	CAITCCATGCTGGTTGTCCGGTG	33.31	0.01	- 11.70	0	下调 Down
novel-ach-miR271	TTTTGGGATCAGATTAAGAC	1.57	0.01	- 7.30	7.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR272	AATTGGAGAGGACAATTGGTCT	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR277	GCCCGTCTAGCTCAGTTGGTAG	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR280	TAACTAAGTGTAGATATGGCT	2.59	0.01	- 8.02	0	下调 Down
novel-ach-miR283	CGGACCAATGACCATCAAGTTG	17.67	0.01	- 10.79	0	下调 Down
novel-ach-miR284	TCTCCAAGAGATTCTAGAACC	1.85	0.01	- 7.53	1.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR285	CAITTTGGATCTTGGGCTTCTCC	4.81	0.01	- 8.91	0	下调 Down
novel-ach-miR288	GAGCTGTGATGACATCTGCGCT	6.66	0.01	- 9.38	0	下调 Down
novel-ach-miR290	CTTTGAGTATTGGATTATTGAT	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR296	TGGTCTGGACTGATATGAAGTC	4.72	0.01	- 8.88	0	下调 Down
novel-ach-miR299	TTTTCACACTCGTTGTACCGTG	2.04	0.01	- 7.67	0	下调 Down
novel-ach-miR302	TATGCTAATGCTGTTGGTGCCT	9.34	0.01	- 9.87	0	下调 Down
novel-ach-miR307	CCGGGTAGGCTTTGGCGATAAT	1.67	0.01	- 7.38	3.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR308	ATAGAGAGAGAGCACTGATGTG	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR310	TAAGTGTAATATATTGGGCT	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR313	TGTACCCGGCCTGATTCCTTCT	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR314	ACAAGGATGTTGATTGAATGAC	1.57	0.01	- 7.30	7.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR315	TAAATAAATATATAAAGTGGGC	1.76	0.01	- 7.46	2.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR317	TAAAAGAGAGAGAGGAAAGGCT	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR321	TGACTAGTTTCGATGTAATCCT	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR322	TGAGATGAGGGACTTCAAGAAC	9.25	0.01	- 9.85	0	下调 Down
novel-ach-miR323	CTTCTTTAATCTGTGTATCCCG	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR324	CTAGATCCTGAAGTATATGACT	1.67	0.01	- 7.38	3.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR326	TCGAAGGTCAACGGTGGCGCC	3.70	0.01	- 8.53	0	下调 Down
novel-ach-miR329	AGAGGTCTGATAGGAGTAAGCC	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR330	CATCGGTCAAGAGTCGTCTCC	54.86	0.01	- 12.42	0	下调 Down
novel-ach-miR331	AGACGACTCCTGACCGATGTG	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR332	TATTTGGAGGCGCGTCAGGTT	2.04	0.01	- 7.67	0	下调 Down
novel-ach-miR333	TTATAGACAGCATAGAGGGGC	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR334	CGATTCCACACAGCGCGCCA	5.18	0.01	- 9.02	0	下调 Down
novel-ach-miR335	TCCGGAATCCAAACACAGCCT	3.24	0.01	- 8.34	0	下调 Down
novel-ach-miR339	TTACGTATCGGAATTTGGCC	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR347	GCAACATGATGAATCTGAAC	1.94	0.01	- 7.60	0	下调 Down
novel-ach-miR349	TTGACGTACTGGGGTTAAACC	4.35	0.01	- 8.76	0	下调 Down
novel-ach-miR350	ATTTTGGGTTTGGACTTAGCC	2.13	0.01	- 7.73	0	下调 Down
novel-ach-miR355	TCCTTGATCCAAAGACAGCCT	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR356	TGTGAGTATGCATTGTACATG	1.39	0.01	- 7.12	2.50E-05	下调 Down
novel-ach-miR358	ACAAATAAGTAGGACCCGTC	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR362	ATTCAGGCTCTGTTTGGCACC	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR364	TCCTTGATCCAAACACAGCCT	1.48	0.01	- 7.21	1.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR367	TTCAAAGTTGAGTGTATGCCT	1.57	0.01	- 7.30	7.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR369	TTGACTAGAGCCGTTGACCGA	1.57	0.01	- 7.30	7.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR372	ATATAGTTTGGCTGGGCACTT	35.16	0.01	- 11.78	0	下调 Down
novel-ach-miR373	TTTTCAAACACACTTGGACCC	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR375	CTCGAGATTGATTGTGAAGAT	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR376	TCCAGATCTGATGACCCATTA	1.30	0.01	- 7.02	4.80E-05	下调 Down
novel-ach-miR377	TGGGTCATCAGATCTGGACCT	1.48	0.01	- 7.21	1.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR379	TTTAGGATGAACCCAGAGAA	2.22	0.01	- 7.79	0	下调 Down
novel-ach-miR380	CGCAGTAGATCTGAGCGGCCT	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR382	TTTTGGACCAAGAAAAATTCT	1.20	0.01	- 6.91	9.30E-05	下调 Down
novel-ach-miR383	TGATGAATGATGGATGCCCAT	1.67	0.01	- 7.38	3.00E-06	下调 Down
novel-ach-miR384	TTCCAAGCAGTTTGTGATGAC	1.02	0.01	- 6.67	3.48E-04	下调 Down
novel-ach-miR389	ATTCAGCGGATCCTTGGGCCC	1.11	0.01	- 6.79	1.80E-04	下调 Down
novel-ach-miR390	CGGAGGTTGGTTTGGATTCTC	1.94	0.01	- 7.60	0	下调 Down
novel-ach-miR392	TACATTAGGAGTGGCTTGACC	2.04	0.01	- 7.67	0	下调 Down
novel-ach-miR394	TTCGAGAACCAATGACGCCT	2.50	0.01	- 7.96	0	下调 Down
novel-ach-miR396	AATTGACGGAAGGGCACCACC	263.96	0.01	- 14.69	0	下调 Down
novel-ach-miR397	TTCATCTGTAGCCTTTGCCC	2.87	0.01	- 8.16	0	下调 Down
novel-ach-miR398	GAGTAATGATTAACAGGGAC	18.13	0.01	- 10.82	0	下调 Down
novel-ach-miR399	GGTACAGAGAAGAGAAGATG	1.85	0.01	- 7.53	1.00E-06	下调 Down

2.5 显著差异表达 miRNA 靶基因预测分析

选取表达差异显著的 170 个 miRNA 家族, 使用在线 sRNA 靶基因预测工具 psRNATarget, 将 miRNA 比对到猕猴桃基因组 CDS 序列 (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/kiwi/home.cgi>) 进行靶基因的预测。经分析, 共有 144 个 miRNA 家族预测得到了 608 个 (非冗余) 靶基因序列。

对预测得到的靶基因注释进行分析, 其高频 InterPro 义项分布如表 3。其中, 调控 IPR027417 和 IPR011009 的 miRNA 数量显著高于其他条目, 意味着具有包含核苷三磷酸水解酶的磷酸环和蛋白激酶类似结构域这两种结构的蛋白 (基因) 在猕猴桃性别决定过程中具有重要作用。

表 3 显著差异表达 miRNA 预测靶基因的高频 InterPro 义项分布
Table 3 Enriched InterPro terms of targets of differentially expressed miRNAs

InterPro 登录号 InterPro accession number	相关 miRNA 家族数 Related miRNA families count	InterPro 注释 InterPro annotation
IPR027417	44	包含核苷三磷酸水解酶的磷酸环 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
IPR011009	32	蛋白激酶类似结构域 Protein kinase-like domain
IPR018289	19	MULE 转座酶 MULE transposase domain
IPR013320	18	伴刀豆球蛋白 A 类凝集素/葡聚糖酶结构域 Concanavalin A-like lectin/glucanase domain
IPR004333	14	转录因子, SBP 盒 Transcription factor, SBP-box
IPR002885	13	三角状五肽重复 Pentatricopeptide repeat
IPR017761	13	漆酶 Laccase
IPR001810	12	F - 盒结构域 F-box domain
IPR009057	12	同源域类似结构 Homeodomain-like
IPR016177	11	DNA 结合结构域 DNA-binding domain
IPR011990	11	类似三角状四肽的螺旋结构域 Tetratricopeptide-like helical domain
IPR016024	10	犴狸型折叠 Armadillo-type fold
IPR013083	9	锌指结构, RING/FYVE/PHD 型 Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
IPR012677	9	结合核苷酸的 alpha-beta 辫状结构域 Nucleotide-binding alpha-beta plait domain
IPR005225	8	小 GTP 结合蛋白结构域 Small GTP-binding protein domain
IPR016040	8	NAD (P) 结合结构域 NAD(P)-binding domain
IPR001650	7	解旋酶, C 端 Helicase, C-terminal
IPR015943	7	包含类似 WD40/YVTN 重复的结构域 WD40/YVTN repeat-like-containing domain
IPR021109	7	天门冬氨酸肽酶结构域 Aspartic peptidase domain
IPR023214	7	HAD 类似结构域 HAD-like domain
IPR010525	6	生长素响应因子 Auxin response factor
IPR001461	6	天门冬氨酸肽酶 Aspartic peptidase
IPR015300	6	DNA 结合伪管结构域 DNA-binding pseudobarrel domain
IPR002041	5	Ran GTP 酶 Ran GTPase
IPR002902	5	Gnk2 同源结构域 Gnk2-homologous domain
IPR001806	5	小 GTP 酶超家族 Small GTPase superfamily
IPR007527	5	锌指结构, SWIM 型 Zinc finger, SWIM-type
IPR015500	5	肽酶 S8, 枯草杆菌蛋白酶相关 Peptidase S8, subtilisin-related
IPR008972	5	杯蛋白 Cupredoxin
IPR001611	5	亮氨酸富集重复区 Leucine-rich repeat
IPR001757	5	P 型 ATP 酶 P-type ATPase
IPR011598	5	Myc 型, 碱性螺旋 - 环 - 螺旋结构域 Myc-type, basic helix-loop-helix (bHLH) domain
IPR011043	5	半乳糖氧化酶/kelch, beta 促进因子 Galactose oxidase/kelch, beta-propeller
IPR017451	5	F 盒联合相互作用结构域 F-box associated interaction domain
IPR023828	5	肽酶 S8, 枯草杆菌蛋白酶, 丝氨酸激活位点 Peptidase S8, subtilisin, Ser-active site

进一步对靶基因进行 Gene Ontology 注释得到表 4 所示结果。在细胞组分分支中，细胞和细胞部件这两个条目涉及到的基因显著多于其他条目，意味着在猕猴桃花的性别分化过程中有很多参与决定细胞和细胞结构的基因参与；在分子功能分支中，结合和催化这两个条目涉及到更多的基因，说明分子间结合和催化反应在猕猴桃花性别分化中有重要作用；在生物学过程分支中则是代谢过程和细胞过程涉及的基因占最大比例，则表明在性别分化反应中发生了重要的代谢反应和胞间通讯。

表 4 显著差异表达 miRNA 预测靶基因 Gene Ontology 注释分析
Table 4 Gene Ontology classification of target gene of significantly differentially expressed miRNAs

GO 类别	GO 登录号	相关基因数	相关基因比例	GO 术语
GO domains	GO accession number	Related genes number	Related genes percent	GO term
细胞组分 Cellular component	GO: 0005576	13	1.4	胞外区域 Extracellular region
	GO: 0005623	118	12.5	细胞 Cell
	GO: 0031974	4	0.4	膜内腔 Membrane-enclosed lumen
	GO: 0031975	7	0.7	外壳 Envelope
	GO: 0032991	26	2.8	大分子复合物 Macromolecular complex
	GO: 0043226	59	6.3	细胞器 Organelle
	GO: 0044422	18	1.9	细胞器组分 Organelle part
分子功能 Molecular function	GO: 0044464	118	12.5	细胞部件 Cell part
	GO: 0016209	5	0.5	抗氧化剂活性 Antioxidant activity
	GO: 0060089	3	0.3	分子转导蛋白活性 Molecular transducer activity
	GO: 0030528	5	0.5	转录调节因子活性 Transcription regulator activity
	GO: 0045182	1	0.1	翻译调控因子活性 Translation regulator activity
	GO: 0030234	3	0.3	酶调节因子活性 Enzyme regulator activity
	GO: 0005198	2	0.2	结构分子活性 Structural molecule activity
	GO: 0003824	165	17.5	催化活性 Catalytic activity
	GO: 0005488	266	28.2	结合 Binding
	GO: 0005215	17	1.8	转运体活性 Transporter activity
生物过程 Biological process	GO: 0044085	8	0.8	细胞组分产生 Cellular component biogenesis
	GO: 0000003	4	0.4	生殖 Reproduction
	GO: 0016043	11	1.2	细胞组分组织 Cellular component organization
	GO: 0008152	168	17.8	代谢过程 Metabolic process
	GO: 0022414	4	0.4	生殖过程 Reproductive process
	GO: 0043473	49	5.2	着色 Pigmentation
	GO: 0051179	40	4.2	定位 Localization
	GO: 0050896	16	1.7	响应刺激 Response to stimulus
	GO: 0009987	154	16.3	细胞过程 Cellular process
	GO: 0040007	1	0.1	生长 Growth
	GO: 0032501	1	0.1	多细胞生物过程 Multicellular organismal process
	GO: 0010926	5	0.5	组织结构形成 Anatomical structure formation
	GO: 0051704	4	0.4	多生物体过程 Multi-organism process
	GO: 0065007	50	5.3	生物调节 Biological regulation
	GO: 0051234	40	4.2	定位的确立 Establishment of localization

从猕猴桃基因组可知，第 25 连锁群（Chr25）为猕猴桃性染色体，故对位于 Chr25 上的 miRNA 进行了重点分析。共有 78 个 miRNA 能完全比对到 Chr25 上，其中有 26 个表达差异显著，只有 3 个（novel-ach-miR60、novel-ach-miR283 和 novel-ach-miR362）能形成 miRNA 前体茎环结构。这 3 个 miRNA 靶基因注释如表 5。进一步分析发现，novel-ach-miR60 为 Chr25 特有，而 novel-ach-miR283 和 novel-ach-miR362 是雌花特异表达的，Chr25 上没有预测到雄花特异表达的 miRNA。

表 5 Chr25 上差异表达的 miRNA 及其靶基因注释
Table 5 Differentially expressed miRNAs on Chr25 and their targets

miRNA	表达 (雄花/雌花) Expression mode (male/female)	靶基因 Target gene	靶基因注释* Annotation of target gene
novel-ach-miR60	下调 Down	Achn202541	多萜长醇 - 二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基; 包含 IPR007676 (核糖体结合蛋白 I) 和 IPR010326 (Exocyst 复合体组分 Sec6) Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit; Contains IPR007676 (Ribophorin I), IPR010326 (Exocyst complex component Sec6)
novel-ach-miR283	下调 Down	Achn389831	核孔膜糖蛋白 210, 包含 IPR008964 (侵袭素/紧密黏附素的细胞粘附) Nuclear pore membrane glycoprotein 210; Contains IPR008964 (Invasin/intimin cell-adhesion)
novel-ach-miR362	下调 Down	Achn204981	FAR1 蛋白相关序列 I; 包含 IPR001878 (锌指, CCHC 型), IPR004330 (MULE 转座酶结构域) Protein FAR1-related sequence 1; contains IPR001878 (Zinc finger, CCHC-type), IPR004330 (FAR1 DNA binding domain), IPR007527 (Zinc finger, SWIM-type), IPR018289 (MULE transposase domain)
		Achn298021	Squamosa 启动子结合蛋白; 包含 IPR004333 (转录因子, SBP 盒) Squamosa promoter-binding protein; Contains IPR004333 (Transcription factor, SBP-box)

* <http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/kiwi/home.cgi>.

2.6 miRNA 表达的实时荧光定量验证分析

为了验证经测序所得 miRNA 表达谱的可靠性, 随机选取了 11 个显著差异表达的 miRNA, 使用 stem-loop 的逆转录引物进行逆转录, 并采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 相对定量检测。定量的结果如图 2 所示。大部分 miRNA 经 qRT-PCR 和深度测序定量后, 其在猕猴桃雌、雄花间的相对表达模式是一致的, 这证明经深度测序得到的 miRNA 表达结果是可靠的。但也有几个 miRNA 经 Real Time PCR 和测序得到了不同的相对表达模式, 如 MIR172, MIR397 及 novel-ach-miR18; 特别是 MIR397 甚至呈现出相反的对表达趋势。不一致的表达模式可能是由于两种技术在进行 miRNA 扩增时的效率差异所致, 也可能是由于测序技术得到的 miRNA 表达量是综合了该 miRNA 家族所有成员的表达量, 而 stem-loop qPCR 技术只是特异性地检测了该 miRNA 家族中的一种 miRNA 所致。

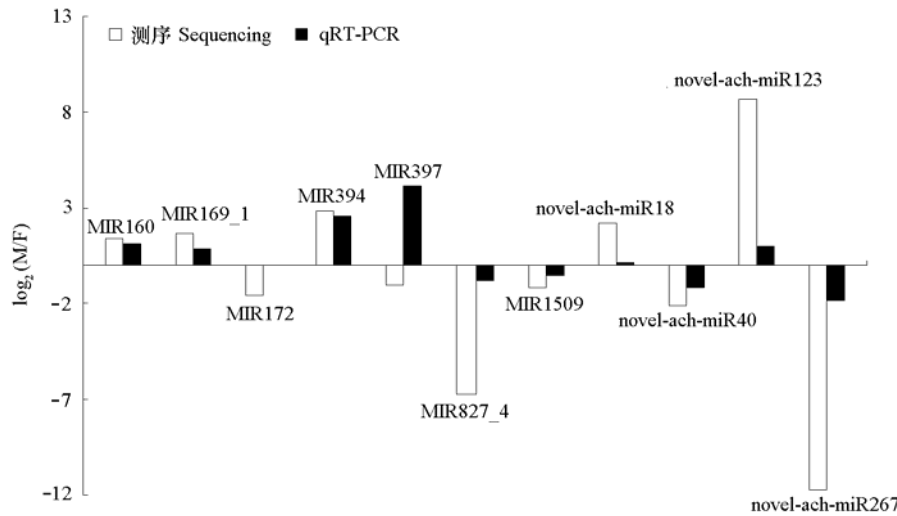


图 2 miRNA qRT-PCR 与高通量测序相对定量结果比较
Fig. 2 miRNA expression validation by qRT-PCR

3 讨论

在雌雄异株植物中,性染色体间的序列差异使得图位克隆技术难以应用,目前尚未有经过试验验证的性别决定基因的报道(Zhang et al., 2014)。尽管已有研究表明,miRNA在植物性别决定和花发育过程中具有重要作用,但还没有miRNA参与雌雄异株植物性别决定的直接证据(Chuck et al., 2007; Sun et al., 2010; Tuskan et al., 2012; Luo et al., 2013)。本研究试图利用第二代测序技术,对雌雄异株植物猕猴桃的雌、雄花进行测序,以揭示可能参与猕猴桃性别决定的miRNA及蛋白质基因。测序所得序列经质量控制、比对到猕猴桃基因组后,雌、雄花分别鉴定得到39和37个保守miRNA家族,以及293和187个新miRNA家族。miRNA的保守性不仅体现在猕猴桃与其他物种之间,在猕猴桃雌、雄株之间也非常明显(雌、雄花有37个共有的保守miRNA家族,但却只共有80个新miRNA家族),这与杨树雌、雄花的情况(Song et al., 2013)非常类似。相对于雄花,雌花中鉴定得到更多的miRNA,这可能是由于雌花中合成了更多的miRNA参与基因表达调控,但也可能是由于在将miRNA比对到参考基因组时采用了较为严谨的参数(不允许错配),在只拥有猕猴桃雌株基因组(只有X染色体)的情况下,很多因为雌、雄株之间单核苷酸多态性(SNP)的存在而导致的匹配失败。这种结果也发生在同样只拥有雌株基因组的杨树中,而在同时拥有雌、雄、两性3种基因组序列的木瓜中表现并不明显(Aryal et al., 2014),这支持了雌、雄株基因组差异对比对结果影响更大的推断。因此,对于猕猴桃雄株基因组或其Y染色体的测序将可能极大地方便和促进猕猴桃性别分化的研究。

对预测得到的显著差异表达miRNA靶基因进行功能注释和分析发现,在InterPro中IPR027417和IPR011009的富集程度远高于其他义项。从InterPro注释可知,IPR027417为包含核苷三磷酸水解酶的磷酸环结构域(P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase),该类蛋白主要通过水解结合态核苷三磷酸的beta-gamma磷酸键释放能量,用于引导其他生物分子构象的改变。这意味着有很多新蛋白或其他生物学分子合成和参与到了猕猴桃花的性别分化。IPR011009是蛋白激酶类结构域,而蛋白激酶在细胞信号转导和调控过程中具有重要作用。这则说明在猕猴桃花分化过程中伴随着一些信息传递和生理生化过程。GO注释中的生物学过程的富集分布也印证了这一结果。

对猕猴桃性染色体上的miRNA进行重点分析,共预测得到3个具有较高可信度的miRNA。值得注意的是,这3个miRNA都表现出雌花特异或上调表达。通常认为,植物Y染色体的进化伴随着与X染色体的重组抑制及基因丢失(Ming et al., 2011),这可能是导致只有雌花特异或上调表达的miRNA(基因)的原因;不过,也可能是由于使用了只包含X染色体序列的参考基因组(因存在SNP而导致miRNA与Y染色体对应序列匹配失败)、测序深度不够或使用了较为严格的miRNA筛选标准等原因所致。进一步对这3个miRNA预测得到的4个靶基因(Achn202541、Achn389831、Achn204981和Achn298021)在Swiss-Prot中进行查询分析,发现其中有3个与基因表达与蛋白质合成相关(Achn202541、Achn204981和Achn298021),而Achn389831为核孔蛋白组分,参与mRNA及蛋白质的转运。令人感兴趣的是novel-ach-miR362的靶基因Achn298021,其编码的Squamosa启动子结合蛋白为植物特有的转录因子,参与开花时间的调节、时期转换,更为重要的是,该基因可能参与植物花药、花粉的发育,例如拟南芥突变株的花粉活力明显下降(Unte et al., 2003; Xing et al., 2010);通常认为miRNA对mRNA的表达是起负调控作用的(Bartel, 2004),由于本研究中没有在猕猴桃雄花中检测到novel-ach-miR362的表达,可能意味着其靶基因Achn298021在雄花中相对较高的表达量即能更好地保证雄蕊发育。因此,novel-ach-miR362及Achn298021基因的表达与其

功能验证可作为下一步猕猴桃花性别分化研究的一个方向。

总之, 本研究中得到了一系列在猕猴桃雌、雄花中差异表达的 miRNA, 但由于猕猴桃基因组数据有限, 及缺乏猕猴桃雌、雄花的转录组、蛋白组数据, 对这些 miRNA 功能的鉴定和分析还非常有限, 今后在这些方面数据的积累将能更快速地推进猕猴桃性别分化机理的研究。

References

- Aryal R, Jagadeeswaran G, Zheng Y, Yu Q, Sunkar R, Ming R. 2014. Sex specific expression and distribution of small RNAs in papaya. *BMC Genomics*, 15 (1): 20.
- Aryal R, Ming R. 2014. Sex determination in flowering plants: Papaya as a model system. *Plant Science*, 217: 56 – 62.
- Audic S, Claverie J-M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7 (10): 986 – 995.
- Bartel D P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116 (2): 281 – 297.
- Brundell D. 1975. Flower development of the Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.) II. Development of the flower bud*. *New Zealand Journal of Botany*, 13 (3): 485 – 496.
- Charlesworth D. 2013. Plant sex chromosome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 64 (2): 405 – 420.
- Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, Zhou Z, Lee D H, Nguyen J T, Barbisin M, Xu N L, Mahuvakar V R, Andersen M R. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33 (20): e179 – e179.
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S. 2007. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nature Genetics*, 39 (12): 1517 – 1521.
- Coimbra S, Torrao L, Abreu I. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42 (6): 537 – 541.
- Falasca G, D'Angeli S, Biasi R, Fattorini L, Matteucci M, Canini A, Altamura M M. 2013. Tapetum and middle layer control male fertility in *Actinidia deliciosa*. *Annals of Botany*, 112 (6): 1045 – 1055.
- Ferguson A. 1984. Kiwifruit: A botanical review. *Horticultural Reviews*, 6: 1 – 64.
- Fraser L, Tsang G, Datson P, De Silva H N, Harvey C, Gill G, Crowhurst R, McNeilage M. 2009. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics*, 10 (1): 102.
- Gao Z, Shi T, Luo X, Zhang Z, Zhuang W, Wang L. 2012. High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with pistil development in Japanese apricot. *BMC Genomics*, 13 (1): 371.
- Hardenack S, Ye D, Saedler H, Grant S. 1994. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell Online*, 6 (12): 1775 – 1787.
- Hu Dong-nan, Wang Zi-jian, Jiang Chun-yan, Shanguan Xin-chen. 2013. Study on the flower sex differentiation regular of young *Cyclocarya paliurus*. *Journal of Fujian College of Forestry*, (1): 52 – 55. (in Chinese)
- 胡冬南, 王子坚, 江春艳, 上官新晨. 2013. 青钱柳幼树花性别分化规律. *福建林学院学报*, (1): 52 – 55.
- Huang H, Zhong Y, He Z. 2002. Cytogenetic study of diploid *Actinidia chinensis*-karyotype, morphology of sex chromosomes at primary differentiation stage and evolutionary significance// V International Symposium on Kiwifruit, *Acta Horticultural*, 610: 379 – 385. .
- Huang S, Ding J, Deng D, Tang W, Sun H, Liu D, Zhang L, Niu X, Zhang X, Meng M. 2013. Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis*. *Nature Communications*, 4: 2640.
- Jiang J, Lv M, Liang Y, Ma Z, Cao J. 2014. Identification of novel and conserved miRNAs involved in pollen development in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics*, 15 (1): 146.
- Khraiwesh B, Pugalenth G, Fedoroff N V. 2013. Identification and analysis of red sea mangrove (*Avicennia marina*) microRNAs by high-throughput sequencing and their association with stress responses. *PLoS ONE*, 8 (4): e60774.
- Luo Y, Guo Z, Li L. 2013. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Developmental Biology*, 380: 133 – 144.

- Matsunaga S, Kawano S. 2001. Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biology*, 3 (5): 481 – 488.
- Matsunaga S, Uchida W, Kejnovsky E, Isono E, Moneger F, Vyskot B, Kawano S. 2004. Characterization of two *SEPALLATA* MADS-box genes from the dioecious plant *Silene latifolia*. *Sexual Plant Reproduction*, 17 (4): 189 – 193.
- McNeilage M. 1995. Progress in breeding hermaphrodite kiwifruit cultivars and understanding the genetics of sex determination//III International Symposium on Kiwifruit, *Acta Horticultural*, 444: 73 – 78.
- Ming R, Bendahmane A, Renner S S. 2011. Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 485 – 514.
- Polito V S, Grant J A. 1984. Initiation and development of pistillate flowers in *Actinidia chinensis*. *Scientia Horticulturae*, 22 (4): 365 – 371.
- Scoccianti V, Speranza A, Crinelli R, Calzoni G L, Biasi R, Altamura M M, Bagni N. 1999. Development-related changes of protein ubiquitination in pollen from male and female kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Physiologia Plantarum*, 107 (1): 128 – 135.
- Song Y, Ma K, Ci D, Zhang Z, Zhang D. 2013. Sexual dimorphism floral microRNA profiling and target gene expression in andromonoecious poplar (*Populus tomentosa*). *PLoS ONE*, 8 (5): e62681.
- Sun J J, Li F, Li X, Liu X C, Rao G Y, Luo J C, Wang D H, Xu Z H, Bai S N. 2010. Why is ethylene involved in selective promotion of female flower development in cucumber? *Plant Signaling & Behavior*, 5 (8): 1052.
- Tang F, Hajkova P, Barton S C, Lao K, Surani M A. 2006. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 34 (2): e9.
- Tanurdzic M, Banks J A. 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell Online*, 16 (suppl 1): 61 – 71.
- Taylor R S, Tarver J E, Hiscock S J, Donoghue P C. 2014. Evolutionary history of plant microRNAs. *Trends in Plant Science*, 19 (3): 175 – 182.
- Tuskan G A, DiFazio S, Faivre-Rampant P, Gaudet M, Harfouche A, Jorge V, Labbé J L, Ranjan P, Sabatti M, Slavov G. 2012. The obscure events contributing to the evolution of an incipient sex chromosome in *Populus*: A retrospective working hypothesis. *Tree Genetics & Genomes*, 8 (3): 559 – 571.
- Unte U S, Sorensen A M, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P. 2003. *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 15 (4): 1009 – 1019.
- Varkonyi-Gasic E, Lough R H, Moss S M, Wu R, Hellens R P. 2012. Kiwifruit floral gene *APETALA2* is alternatively spliced and accumulates in aberrant indeterminate flowers in the absence of miR172. *Plant Molecular Biology*, 78 (4 – 5): 417 – 429.
- Varkonyi-Gasic E, Moss S M, Voogd C, Wu R, Lough R H, Wang Y-Y, Hellens R P. 2011. Identification and characterization of flowering genes in kiwifruit: Sequence conservation and role in kiwifruit flower development. *BMC Plant Biology*, 11 (1): 72.
- Vyskot B, Barbacar N, Georgiev S, Moneger F. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology*, 127 (4): 1418 – 1424.
- Wang Z J, Huang J Q, Huang Y J, Li Z, Zheng B S. 2012. Discovery and profiling of novel and conserved microRNAs during flower development in *Carya cathayensis* via deep sequencing. *Planta*, 236 (2): 613 – 621.
- White J. 1990. Pollen development in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*: Histochemistry of the microspore mother cell walls. *Annals of Botany*, 65 (3): 231 – 239.
- Wu H M, Cheung A Y. 2000. Programmed cell death in plant reproduction//Programmed Cell Death in Higher Plants. Netherlands: Springer: 23 – 37.
- Xing S, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. 2010. miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 22 (12): 3935 – 3950.
- Yang Miao-xian, Xiao De-xing, Liang Hong, Liu Wen. 2011. Cytomorphological observation on sex differentiation of *Actinidia chinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 257 – 264. (in Chinese)
- 杨妙贤, 肖德兴, 梁红, 刘文. 2011. 中华猕猴桃性别分化的细胞形态学观察. *园艺学报*, 38 (2): 257 – 264.
- Zhang J, Boualem A, Bendahmane A, Ming R. 2014. Genomics of sex determination. *Current Opinion in Plant Biology*, 18: 110 – 116.
- Zhao C Z, Xia H, Frazier T P, Yao Y Y, Bi Y P, Li A Q, Li M J, Li C S, Zhang B H, Wang X J. 2010. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 10 (1): 3.
- Zhou M, Luo H. 2013. MicroRNA-mediated gene regulation: Potential applications for plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 83 (1 – 2): 59 – 75.