

# 落叶松体胚发育中 12 个针叶树 特异 microRNAs 表达分析

张俊红<sup>1</sup>, 吴涛<sup>1</sup>, 韩素英<sup>2</sup>, 齐力旺<sup>1</sup>, 张守攻<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

**摘要:**以落叶松体细胞胚胎发育 8 个阶段的材料构建小 RNA 文库,进行了 Solexa 测序、miRNA 鉴定、靶基因预测、qRT-PCR 定量分析等研究。结果表明:发现的 87 个 miRNAs 中,29 个为针叶树特异的,来自 12 个家族,分别为 miR946、miR947、miR950、miR951、miR1311、miR1312、miR1313、miR1314、miR1316、miR3701、miR3702 和 miR3704,其中 25 个长度为 22nt,且在小 RNA 文库中的最低拷贝数为 18(miR1311),最高拷贝数为 33 009(miR950)。发现 12 个 miRNA 家族的 34 个靶基因可能参与生长发育、抗病、AGO 反馈调节等多方面遗传调控;qRT-PCR 分析表明:72% miRNAs 表达次高峰在后期单胚或早期子叶胚,在中期子叶胚最低,最高峰在后期子叶胚,分别与子叶形成、胚胎后熟、胚胎休眠的生理活动相吻合,而 miRNA 前体的表达模式不同于 miRNA,前体变化幅度小于成熟体。

**关键词:**日本落叶松;体细胞胚胎;microRNA;针叶树;表达分析

中图分类号:S791.22

文献标识码:A

## Expression Analysis of 12 miRNA Families Specific to Conifers during Somatic Embryogenesis of Larch

ZHANG Jun-hong<sup>1</sup>, WU Tao<sup>1</sup>, HAN Su-ying<sup>2</sup>, QI Li-wang<sup>1</sup>, ZHANG Shou-gong<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** In order to identify miRNA and investigate its expression profile during somatic embryogenesis (SE) of larch, a small RNA library was constructed and sequenced by Solexa technique, and expression analysis of miRNAs and four precursors during eight developmental stages of SE was evaluated by qRT-PCR. The results demonstrated that a total of 87 miRNAs was identified, of which 29 miRNAs from 12 families were specific to conifers, including miR946, miR947, miR950, miR951, miR1311, miR1312, miR1313, miR1314, miR1316, miR3701, miR3702 and miR3704, which could be used for further analysis and next experiment. Of these, 25 miRNAs were 22nt in length, while 4 miRNAs were 21nt. The abundance of miRNAs varied largely in the small RNA library, such as miR1311 was detected by 18 copies, while miR950 with 33 009 copies. 34 potential target genes were predicted for 12 miRNA families, which were linked to many respects of regulation, including plant growth and development, disease resistance, AGO protein feedback regulation. qRT-PCR analysis showed that, for 72% miRNAs, the minor expression peak was at late single embryo or early cotyledonary embryo, the lowest level was at middle cotyledonary embryo, while the major peak was at late cotyledonary embryo, which was consistent with the physiology events of cotyledon formation, embryo pre-mature, and embryo dormancy. However, the expression model of miRNA precursors

收稿日期:2012-03-13

基金项目:国家“973”计划项目(2009CB119100)和国家自然科学基金(30830086)

作者简介:张俊红(1984—),女,江西新余人,博士研究生。

\* 通讯作者。

sor was differed from that of miRNA, and precursor expression with much smaller extent than that of miRNA. The discovery of miRNAs specific to conifers and their targets using embryonic tissue could provide references for the study on the growth and development of gymnosperms.

**Key words:** *Larix leptolepis*; somatic embryo; microRNA; conifer; expression analysis

microRNA(miRNA)是一类20~22nt长内源小RNA,参与调控植物器官的形态建成、激素应答途径、逆境胁迫和营养代谢等一系列过程<sup>[1-3]</sup>。目前公认20个miRNA家族在陆地植物中保守,而有些miRNA仅在某些进化分支的物种中存在,如miR403仅在双子叶植物中保守<sup>[4]</sup>;因而,分化更早的裸子植物或针叶树是否也有着特异的miRNA已成为待解的问题。目前,miRBase登录的植物miRNA信息绝大部分是被子植物的,关于裸子植物的仅见火炬松(*Pinus taeda* Linn.)和欧洲云杉(*Picea abies* L. Karst)<sup>[5-6]</sup>。裸子植物miRNA信息的匮乏很大程度阻碍了裸子植物miRNA的研究进展。新兴的小RNA文库高通量测序技术的运用可帮助解决这个瓶颈,特别对于基因组庞大、ESTs信息少的针叶树。

日本落叶松(*Larix leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Gord.)是我国北方及亚热带中高山区针叶速生造林用材树种<sup>[7]</sup>。植物体细胞胚胎发生技术是针叶树育种与繁殖的重要手段之一,同时也是研究合子胚胎发育的良好模式体系。Bowe等<sup>[8]</sup>研究发现,裸子植物与被子植物是在石炭纪(约3亿年前)从同一个祖先中分化出来的,这两界植物的种子和胚胎形成过程有着实质性的差异,二者的胚胎发育形态和发育阶段也显著不同,暗示着裸子植物胚胎发育的特异分子生物学机制<sup>[9-10]</sup>。由大部分mRNA在被子植

物和裸子植物中保守<sup>[11-13]</sup>的事实推断,二者的差异可能归因于主调控基因的差异表达或不同活性<sup>[10]</sup>;然而,部分mRNA仅在裸子植物胚胎发育时期表达<sup>[13]</sup>,且裸子植物特别是针叶树有着庞大的基因组(6500Mb~37000Mb)<sup>[14]</sup>,因此,裸子植物胚胎发育过程中可能存在着特异的基因调控网络。本实验构建小RNA文库和Solexa技术测序,分析落叶松体细胞胚胎发育8个阶段的miRNA表达,旨在发现针叶树特异miRNA和分析其在体细胞胚胎发育过程中的表达,为揭示针叶树体细胞胚胎发育中miRNA的遗传调控机理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以日本落叶松体细胞胚胎稳定发生的638细胞系为实验材料,胚性细胞的继代培养(ABA添加前)和成熟培养(ABA添加后)均在黑暗环境下((25±2)℃),根据形态解剖学特征划分为8个发育阶段,依次为:原胚团I(PEM I,继代培养2d)、PEM III(继代培养15d)、早期单胚(成熟培养2d)、中期单胚(成熟培养6d)、后期单胚(成熟培养15d)、早期子叶胚(成熟培养24d)、中期子叶胚(成熟培养29d)和后期子叶胚(成熟培养39d)。

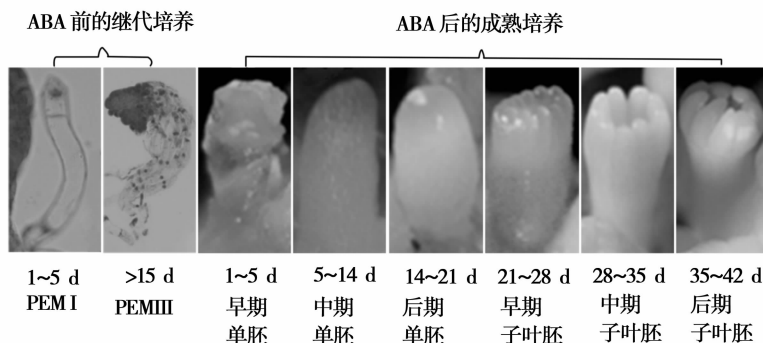


图1 落叶松体细胞胚胎发生8个发育阶段的形态观察

## 1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 Total RNA Purification Kit 购自 NORGEN biotek corporation(加拿大);Small RNA Isolation Kit 购自百泰克生物科技有限公司(北京);NCode VILO miRNA cDNA synthesis kit 购自 invitrogen 公司(美国);SYBR Premix EX Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司(大连);其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2.2 仪器 ND-1000 购自 Agilent 公司(美国);小 RNA 文库构建与测序在 LC Sciences(美国);qRT-PCR 定量分析在 ABI 7500 定量仪(美国)。

## 1.3 研究方法

1.3.1 小 RNA 文库构建和数据分析 Total RNA Purification Kit 提取总 RNA, ND-1000 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量。8 个阶段的总 RNA 等量混合后构建小 RNA 文库、Solexa 技术测序、Illumina 软件读取原始数据、ACGT101-miR program (Version 3.5) 下游分析<sup>[15]</sup>、筛选后的小 RNA 序列比对到 miRBase 17.0 (<http://www.mirbase.org><sup>[16]</sup>), 允许 2 个错配。

1.3.2 靶基因预测 miRNA 序列与落叶松 ESTs 上传至 psRNATarget 网页 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>), 选择功能 3 和默认参数, 预测 miRNA 靶基因<sup>[17]</sup>, 在 Uniprot 注释其功能 (<http://www.uniprot.org/>)。

1.3.3 qRT-PCR 定量研究 Small RNA Isolation Kit 提取小 RNA, ND-1000 和 15% 变性 PAGE 胶检测小 RNA 浓度和质量, NCode VILO miRNA cDNA synthesis kit 将小 RNA 加 A 反转录成 cDNA(稀释 20 倍); Total RNA Purification Kit 提取总 RNA, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA(稀释 5 倍)。SYBR Premix EX Taq kit 在 7500 定量仪器上进行 miRNA 定量分析, 具体步骤按说明书进行。PCR 结束后, 做熔解曲线和 2% 琼脂糖凝胶电泳验证产物的特异性。每个样品 3 次技术重复, 在前期的筛选与分析后, miRNA 成熟体和前体分别选用 5.8S rRNA 和 EF-1 做内参基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 落叶松体细胞胚胎的 miRNA 分析

小 RNA 文库测序发现了 35 个 miRNA 家族, 共 87 个 miRNAs, 其中, 12 个 miRNA 家族包括 29 个 miRNAs 仅在针叶树中保守, 这些特异 miRNA 用于

进一步分析和下游实验。这类 miRNAs 的大部分长度为 22nt, 仅 miR1313b、miR1316a/b 和 miR3702 为 21nt(表 1), 不同于 DCL1 切割产生的传统 21nt 长 miRNA; 然而, 这些 miRNAs 有着植物保守 miRNA 的共性, 如大部分 miRNA 5' 端以“U”开始, 占 89.6%, 仅 miR946a 以“C”, miR1316b 和 miR3702 以“A”开始(表 1)。在小 RNA 文库中, miRNA 家族的丰度变化很大, 最低拷贝数为 18 个(miR1311), 最高拷贝数为 33 009 个(miR950), 且各 miRNA 的丰度变化也很大, 在文库中最低拷贝数为 1 个(miR947b), 最高拷贝数为 9 136 个(miR951a)。

### 2.2 落叶松 miRNA 靶基因的预测

12 个 miRNA 家族预测到 34 个靶基因(表 2), 这些潜在靶基因的功能复杂多样, 参与植物生长发育、抗病、AGO 蛋白反馈调节等多方面遗传调控。具体为: miR946(1 个)、miR947(1 个)和 miR1316(1 个)的 1 个潜在靶基因与转录因子同源; miR946(2 个)、miR950(1 个)、miR1311(2 个)、miR1312(2 个)和 miR3704(1 个)的潜在靶基因与 TIR (CC)-NBS-LRR 病害抵抗蛋白同源; miR947(1 个)、miR1311(1 个)和 miR1313(3 个)的潜在靶基因与蛋白激酶同源。另有 3 个潜在靶基因比对到云杉未知功能 mRNA, 其它的靶基因多为具有某种结构域的蛋白质或功能酶, 如 miR947 的 1 个可能靶基因(JR167569)与 Argonaute 蛋白(AGO)同源, AGO 蛋白包含 PAZ 和 PIWI 2 个结构域, 是 RNA 沉默复合体(RISC)的核心组分<sup>[18]</sup>。

### 2.3 落叶松体胚发生过程中 miRNA 的表达分析

针对 miRNA 在落叶松体细胞胚胎发生过程中的表达分析, 采用 qRT-PCR 技术实时监测了 18 个 miRNA 在体胚发生过程中 8 个发育阶段的表达变化(图 2)。大部分 miRNA 的表达最高峰在后期子叶胚, 次高峰分别在 PEM III (miR3702)、早期单胚(miR947a 和 miR947b)、中期单胚(miR946b)、后期单胚(miR951a、miR951c、miR1311 和 miR1314)和早期子叶胚(miR946a、miR950a-5P/3P、miR950d、miR950e、miR951b、miR1312、miR1316 和 miR3701); 但是, miR1313 表达模式有着实质性的差异, 表达丰度在前 5 个阶段持续升高, 后期单胚达到最高峰, 而早期、中期子叶胚下降, 但后期子叶胚显著上升至次高峰。

## 2.4 落叶松体胚发生过程中 miRNA 前体的表达分析

为分析 miRNA 前体在体胚发生过程中的表达模式,采用 qRT-PCR 技术实时监测了 4 个 miRNA 前体在体胚 8 个发育阶段的表达变化。miRNA 前体的表达模式不同于 miRNA,前体变化幅度小于成熟体(图 3)。表现为:miR946b 前体表达在前 4 个阶段逐渐升高,最高峰在中期单胚,而后期单胚急剧降低,早期子叶胚降至 PEM I 水平,而在中期、后期子

叶胚升高,呈“升-降-升”模式;miR947b 前体丰度在前 3 阶段逐渐升高,最高峰在早期单胚,中期单胚开始的 4 个阶段逐渐降低,但后期子叶胚升高,呈“升-降-升”模式;miR950a 前体水平在继代培养略有降低,而早期单胚显著升高至最高值,中期单胚开始的 5 个阶段逐渐降低,呈“降-升-降”模式;miR951a 前体含量在继代培养中略有降低,而成熟培养后显著升高,中期单胚为表达最高峰,而在后期单胚降低后保持相对稳定水平,呈“降-升-降”模式。

表 1 落叶松中针叶树特异 miRNA 的序列

家族	miRNA	序列(5'—3')	长度/nt	拷贝/个
miR946	miR946a	CAGCCCUUCUCUUAUCCACA AU	22	121
	miR946b	UAAGCAGCCCUUCUCGGAUCCA	22	1 891
miR947	miR947a	UAUCGGAACCGUUAACUGUUUC	22	6 704
	miR947b	UAUCGGAACUGUUACUGUUUC	22	1
miR950	miR950a-5p	UCACGUCUGGGCCACGAUGGUU	22	5 010
	miR950a-3p	UCCGGGCCACGAUGGUUAUGA	22	796
	miR950b-5p	UUACGUCUGGGCCACGAUGGUU	22	8 869
	miR950b-3p	UCUGGACCUCGGUGGUUAUGA	22	164
	miR950c-5p	UGACAUCGGGCCACGAUGGUU	22	238
	miR950c-3p	UAACAUCUGGGCCACGAUGGUU	22	3 576
	miR950d	UCACAUCUGGGCCACGAUGGUU	22	2 427
	miR950e	UGACAUCUGGGCCACGAUGGUU	22	8 582
	miR950f	UCACAUCUGGGCCACGAUGAUU	22	741
	miR950g	UUACAUCUGGGCCACGAUGGUU	22	461
	miR950h	UCUGGGCCACGAUGGUUAUGA	22	2 145
miR951	miR951a	UGUUCUUGACGUCUGGACCACG	22	9 136
	miR951b	UAUUCUUGACGUCUGGACCACG	22	6 940
	miR951c	UGUUCUUGACGUCUGGGCCACG	22	2 168
miR1311	miR1311	UCAGAGUUUUGCCAGUUCGCGC	22	18
miR1312	miR1312	UUCGGAGAGAAAAUGGCGACAU	22	1 053
miR1313	miR1313a	UACCACUGAAAUUAUGUUCGA	22	7
	miR1313b	UACCGCUGAAAUUAUGUUCG	21	44
miR1314	miR1314	UCGGCCUCGAAUGUUAGGAGAA	22	324
miR1316	miR1316a	UCCAUGCACAAACCAUUGGA	21	7
	miR1316b	AGAUCUCCAUGCACAAACCA	21	33
miR3701	miR3701	UAAACAAUGCCCACCCUUGAUC	22	789
miR3702	miR3702	AAUCAUGACUGUGGAUCGGAU	21	477
miR3704	miR3704a	UUUUUCGAACUCCACCUAGACC	22	2 928
	miR3704b	UUCCCAUCCACCGAGACCCA	22	566

表2 针叶树特异 miRNA 的靶基因预测

miRNA	靶基因 (不匹配碱基)	功能注释	得分/期望值
miR946	JR149929 (3.0)	B3 转录因子 琴叶拟南芥 ( <i>Arabidopsis lyrata</i> Linn)	116(291) / 7e-27
	JR186301 (1.5)	CC-NBS-LRR 蛋白 西部白松 ( <i>Pinus monticola</i> Dougl)	69.3(168) / 3e-15
	JR173705 (2.5)	CC-NBS-LRR 蛋白 西部白松	62.4(150) / 9e-10
miR947	JR167569 (2.5)	Argonaute 蛋白 毛果杨 ( <i>Populus trichocarpa</i> Torr. & Gray)	434(1 115) / 6e-141
	JR188864 (3.0)	酪蛋白激酶 蓖麻 ( <i>Ricinus communis</i> L.)	114(126) / 3e-22
	JR152887 (3.0)	26S 蛋白酶体 葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	1 310(1 452) / 0.0
	JR159334 (3.0)	MAR 结合蛋白 甜瓜 ( <i>Cucumis melo</i> L.)	161(407) / 8e-43
miR950	JR149520 (1.5)	GQ04101_N19 mRNA 白云杉 ( <i>Picea glauca</i> Moench.)	125(138) / 2e-25
	JR189718 (2.5)	TIR-NBS-LRR 蛋白 火炬松 ( <i>Pinus taeda</i> Linn.)	95.1(104) / 4e-16
	JR151203 (3.0)	WS0472_P17 mRNA 北美云杉 ( <i>Picea sitchensis</i> Bong.)	821(910) / 0.0
miR951	JR152576 (2.5)	DNA 复制起始因子 MCM7 蓖麻	1 029 (2 661) / 0.0
	JR163963 (3.0)	锌指蛋白 拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	277(709) / 2e-78
	JR184072 (3.0)	GQ03902_F22mRNA 白云杉	260 (288) / 4e-66
miR1311	JR154342 (2.5)	CC-NBS-LRR 蛋白 西部白松	226 (250) / 1e-55
	JR155915 (3.0)	Raline 合成酶 蓖麻	283(725) / 3e-93
	JR186516 (3.0)	受体蛋白激酶 樟子松 ( <i>Pinus sylvestris</i> Linn.)	125 (315) / 4e-32
	JR156291 (1.5)	CC-NBS-LRR 蛋白 糖松 ( <i>Pinus lambertiana</i> Dougl)	76.6(187) / 5e-14
miR1312	JR150774 (3.0)	锌指蛋白 水稻 ( <i>Oryza sativa</i> L.)	218 (556) / 6e-61
	JR167946 (3.0)	GTP 环水解酶 大麦 ( <i>Hordeum vulgare</i> Linn.)	88.2(217) / 4e-30
	JR194270 (3.0)	TIR-NBS 蛋白 火炬松	96.3(238) / 3e-22
	JR186667 (3.0)	TIR-NBS-LRR 蛋白 西部白松	89.4(220) / 1e-19
miR1313	JR162202 (3.0)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 拟南芥	253 (647) / 1e-86
	JR188240 (2.5)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 拟南芥	100(249) / 5e-23
	JR141414 (3.0)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 拟南芥	300(769) / 1e-89
miR1314	JR169597 (3.0)	单脱氢抗坏血酸还原酶 麝香百合 ( <i>Lilium longiflorum</i> Thunb)	201 (222) / 6e-48
miR1316	JR165590 (3.0)	锌指蛋白 欧洲云杉	403(446) / 8e-109
	JR173442 (2.5)	EDS1 类似蛋白 玉米 ( <i>Zea mays</i> L.)	94.0(232) / 2e-20
	JR179016 (2.5)	乙烯不敏感3型转录因子 苹果 ( <i>Malus domestica</i> Borkh.)	194(214) / 4e-46
	JR142955 (3.0)	细胞分裂蛋白 蓖麻	138(152) / 9e-29
	JR141618 (1.0)	EDS1 蛋白 烟草 ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	144(364) / 1e-36
miR3701	-	-	-
miR3702	JR149007 (2.5)	毛状体双折射类似蛋白 拟南芥	80.5 (197) / 6e-15
miR3704	JR143878 (3.0)	Tic22 类似蛋白 拟南芥	174(442) / 1e-50
	JR177371 (3.0)	TIR-NBS 蛋白 火炬松	88.2(217) / 4e-19
	JR179308 (3.0)	60S 核糖体蛋白 拟南芥	333 (368) / 9e-88

注:“-”表示没有。

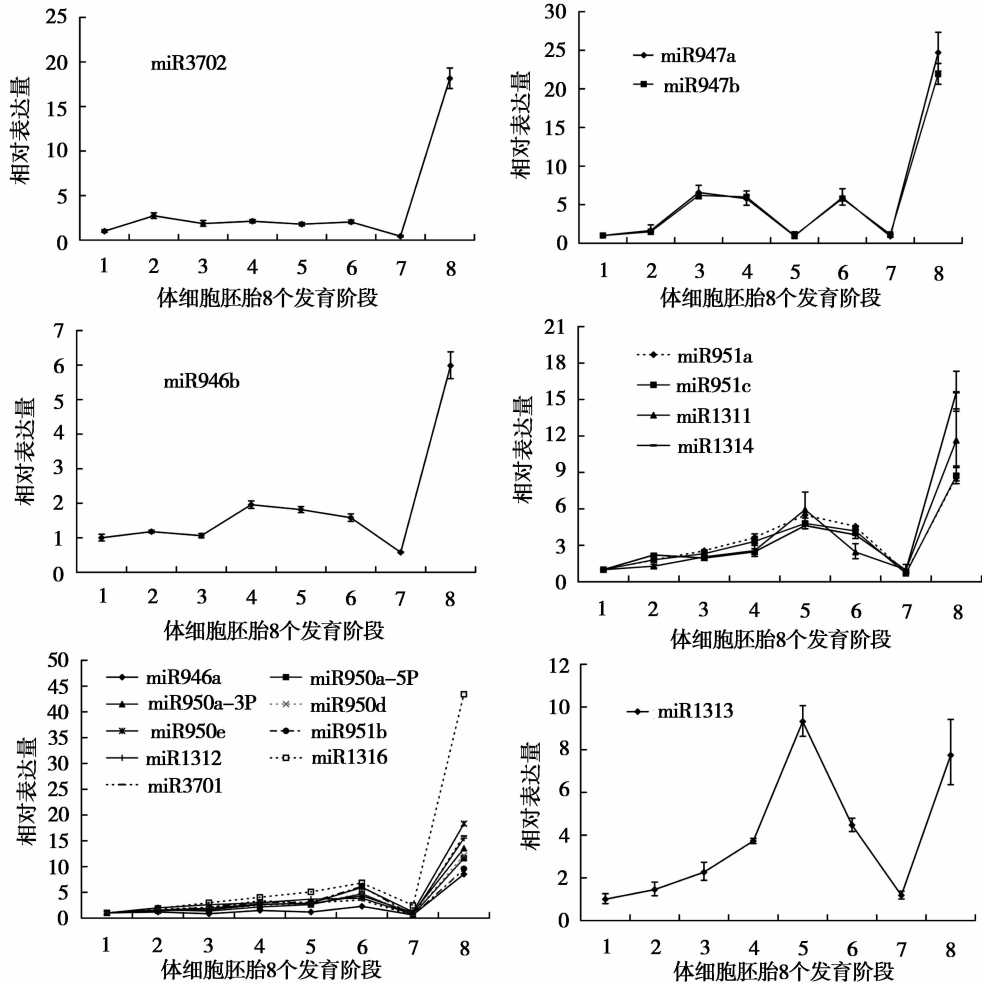


图2 落叶松体细胞胚胎发生过程中的 miRNA 表达分析

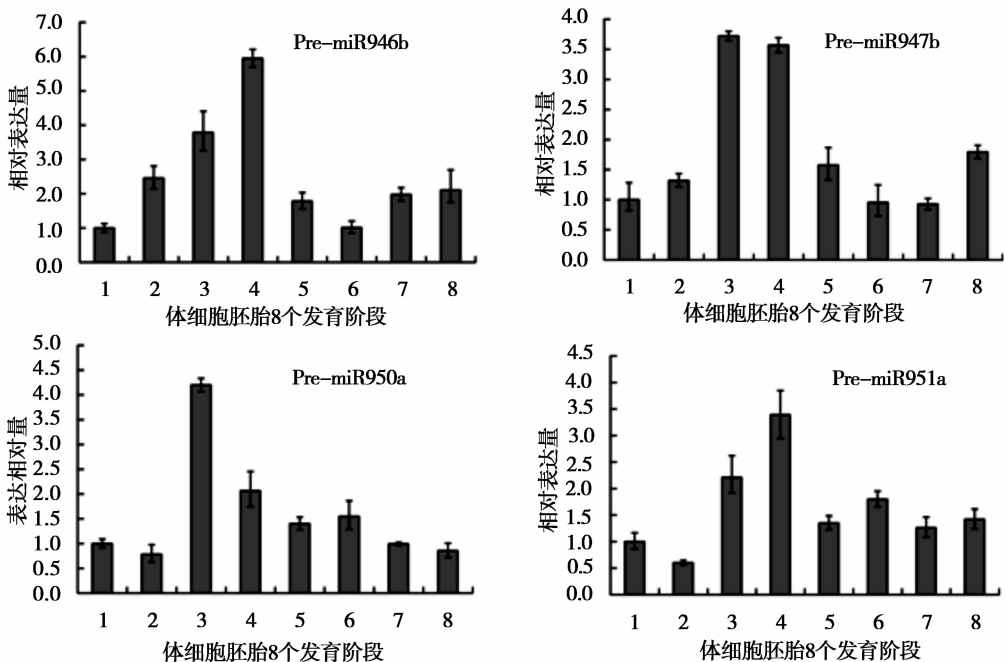


图3 落叶松体胚发生过程中4个 miRNA 前体的表达分析

### 3 结论与讨论

miR946、miR947 和 miR950 等 12 个 miRNA 家族仅在火炬松或云杉中保守,为针叶树特异 miRNA,在针叶树的生长发育中起调控作用,而被子植物中因无进化优势而丢失,或在被子植物和裸子植物分化后,仅在针叶树中进化。miR950 和 miR951 在小 RNA 文库中丰度最高。miR951 在火炬松中证实可切割非蛋白质编码序列(与植物病害抵御蛋白同源)产生短肽或次级 siRNA,miR950 也可能如此<sup>[6]</sup>。短肽是一类植物信号分子,在生长发育中起重要作用,不能由生长素或细胞分裂素替代<sup>[19-20]</sup>。关于 miRNA 调节短肽信号转导进而调控体细胞胚胎发生还有待进一步研究证实。次级 siRNA 可切割靶基因 mRNA<sup>[21]</sup>,靶基因多为快速扩张的基因家族<sup>[22]</sup>,因此,针叶树进化出一类可产生次级 siRNA 的 miRNA,用于平衡那些快速扩张的基因家族。

传统古老植物 miRNA 的长度为 21nt,在陆地植物中保守<sup>[5, 23]</sup>。在落叶松中发现的这类仅在针叶树(火炬松或云杉)中保守的 miRNA,长度为 22nt。研究认为,*MIR* 基因是靶基因反向复制而进化产生的,漫长进化伴着的突变使茎环长度逐渐缩短,序列匹配性逐渐降低<sup>[23-24]</sup>。miRNA 前体的茎环长度与 DCLs 的选择有关,产生不同长度小 RNAs,具体表现为:最古老的 *MIR* 基因转录的较短发夹结构前体,主要由 DCL1 加工产生 21nt miRNA;中间 *IR-MIR* 基因转录的中等长度发夹结构前体,主要由 DCL4 加工产生 21nt miRNA;而原 *MIR*(*proto-MIR*)基因转录的长发夹结构前体,主要由 DCL2 加工产生 22nt miRNA<sup>[24]</sup>。因此,落叶松中这类针叶树特异的 miRNA 可能由原 *MIR* 基因编码,DCL2 切割产生。

大部分针叶树特异 miRNAs 的表达次高峰在后期单胚或早期子叶胚,表达最低值在中期子叶胚,而在后期子叶胚丰度急剧上升至最高峰。后期单胚至早期子叶胚的过渡期间,子叶的大小、数目和对称性等特性均受到高度调控,与 miRNA 上调表达相吻合。中期子叶胚阶段,贮存蛋白基因和晚期丰富蛋白基因高度表达<sup>[25-26]</sup>,miRNA 的下调表达可能直接或间接地保护 mRNA 不被切割,完成胚胎的后熟。后期子叶胚阶段,胚胎已成熟即将进入休眠,参与成熟或后期萌发的基因都需关闭,急剧上调表达的 miRNA 将残留靶基因 mRNA 快速清除。

本文在落叶松体胚发生过程中发现了针叶树特

异的 12 个 miRNA 家族并预测了靶基因,开展了这些 miRNA 在落叶松体细胞胚胎发生过程的表达分析;然而,仍有大量针叶树特异 miRNA 待鉴定和发现,因有限的落叶松 EST 信息,靶基因预测仍不完善。根据 miRNA 的表达模式,只能预测其功能,要验证一个 miRNA 功能,需进行遗传转化,这也是当务之急需进行的工作。

### 参考文献:

- [1] Juarez M T, Kui J S, Thomas J, *et al.* microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity[J]. *Nature*, 2004, 428(6978):84-88
- [2] Parry G, Calderon-Villalobos L I, Prigge M *et al.* Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52):22540-22545
- [3] Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. *RNA*, 2008, 14(5):836-843
- [4] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57:19-53
- [5] Lu S f, Sun Y H, Amerson H, *et al.* MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51:1077-1098
- [6] Yakovlev I A, Fossdal C G, Johnsen O. MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce[J]. *New Phytol*, 2010, 187(4):1154-1169
- [7] 孙晓梅,张守攻,齐力旺,等.日本落叶松自由授粉家系纸浆材材性遗传变异的研究[J]. *林业科学研究*, 2003, 16(5):515-522
- [8] Bowe L M, Gwe'nae'le C, dePamphilis C W. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97:4092-4097
- [9] Filonova L H, Bozhkov P V, von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking[J]. *J Exp Bot*, 2000, 51(343):249-264
- [10] Cairney J, Pullman G S. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis[J]. *New Phytol*, 2007, 176(3):511-536
- [11] Kirst M, Johnson A F, Baucom C, *et al.* Apparent homology of expressed genes from wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda*) with *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(12):7383-7388
- [12] Lorenz W W, Sun F, Liang C, *et al.* Water stress-responsive genes in loblolly pine (*Pinus taeda*) roots identified by analyses of expressed sequence tag libraries[J]. *Tree Physiol*, 2006, 26(1):1-16
- [13] Cairney J, Zheng L, Cowels A, *et al.* Expressed sequence tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62(4-5):485-501
- [14] Ahuja M R, Neale a D B. Evolution of Genome Size in Conifers

- [J]. *Silvae Genetica*, 2005, 54(3):126–137
- [15] Li M, Xia Y, Gu Y, *et al.* MicroRNAome of porcine pre- and post-natal development[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7):e11541
- [16] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue):D152–157
- [17] Dai X, Zhao P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue):W155–159
- [18] Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, *et al.* The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(10):1187–1197
- [19] Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, *et al.* *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(23):13560–13565
- [20] Lindsey K, Casson S, Chilley P. Peptides: new signaling molecules in plants[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(2): 78–83
- [21] Allen E, Xie Z X, Gustafson A M, *et al.* microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants [J]. *Cell*, 2005, 121(2):207–221
- [22] Howell M D, Fahlgren N, Chapman E J, *et al.* Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(3):926–942
- [23] Allen E, Xie Z X, Gustafson A M, *et al.* Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(12):1282–1290
- [24] Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, *et al.* Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(20):6429–6438
- [25] Braybrook S A, Stone S L, Park S, *et al.* Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(9):3468–3473
- [26] Holdsworth M J, Bentsink L, Soppe W J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination[J]. *New Phytol*, 2008, 179(1):33–54