

# 观赏海棠中 *McmiR160a* 的克隆及调控红叶着色的功能分析

罗容丽, 李雨欣, 张洁, 张杰, 姚允聪\*

(农业应用新技术北京市重点实验室/植物生产国家级实验教学示范中心/  
北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206)

**摘要:**【目的】为了验证观赏海棠叶片 *McmiR160a* 对花色素苷代谢的调控作用。【方法】以观赏海棠常色红叶品种‘王族’为试验材料, 确定 *miR160a* 的前体基因序列并对其靶基因进行预测, 克隆 *McmiR160a* 前体序列并构建过表达载体并瞬时转入‘王族’组培苗。通过高效液相色谱和 qRT-PCR 分析瞬时侵染植株中花色素苷的含量及其合成途径中结构基因的表达量。【结果】结果表明, 在观赏海棠中过表达 *McmiR160a* 可以降低花色素苷的含量, 同时降低其靶基因和花色素苷代谢途径关键基因表达水平。【结论】研究结果表明, 观赏海棠中 *McmiR160a* 对花色素苷的合成具有负调控作用。

**关键词:** 观赏海棠; 花色素苷; *McmiR160a*

中图分类号: S664.2 文章编号: 1002-3186 (2019) 01-0000-00 文献标志码: A

## Cloning and functional assay of *McmiR160* regulated red leaf coloration in *Malus* spp.

LUO Rongli, LI Yuxin, ZHANG Jie, ZHANG Jie, YAO Yuncong\*

(Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application/National Demonstration Center for Experimental Plant Production Education/Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:**【Objective】This experiment was to verify the regulation of *miR160a* on anthocyanin biosynthesis in *Malus* spp. leaves.【Methods】We used the leaves of ever-red leaf cultivar ‘Royalty’ of *Malus* spp. as experimental material. The sequence of *miR160a* precursor gene and its target genes were predicted. The precursor sequence of *McmiR160a* was cloned and was transiently over-expressed into the ‘Royalty’ tissue culture seedlings. And then, the contents of anthocyanin and the expressions of key genes in the pathway of anthocyanin biosynthesis were analyzed by HPLC and qRT-PCR.【Results】The results showed that over-expressing of *McmiR160a* in *Malus* spp. leaves decreased the expression of its target gene, the anthocyanin contents, and the expressions of key genes in anthocyanin biosynthesis pathway.【Conclusion】The results suggested that *McmiR160a* negatively regulated anthocyanins biosynthesis *Malus* spp..

**Keywords:** *Malus* spp.; anthocyanin; *McmiR160a*

观赏海棠常色红叶品种‘王族’是常见的园林绿化树种, 色彩艳丽, 树型优美, 广受众人喜爱。其叶片的红色是由于花色素苷的积累导致, 花色素苷是植物色泽形成过程中最重要的组分之一<sup>[1]</sup>, 花

素苷属酚类化合物中的类黄酮类, 是一种水溶性色素, 广泛存在于植物花瓣、果实的组织中及茎叶的表面细胞与下表皮层。

miRNAs (microRNAs) 长度约 21~23 nt, 是一类

收稿日期: 2018-06-12

基金项目: 长城学者项目 (5045243001), 北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目 (2018YJS037)

第一作者: 罗容丽, 硕士研究生在读, 主要从事果树种质资源创新方面的研究。Tel: 010-80799300, E-mail: luorongli1995@163.com

通信作者: 姚允聪, 教授, 主要从事果树种质资源创新与利用方面的研究。Tel: 010-80799300, E-mail: yaoyc\_20@126.com

单链小分子 RNA。这类小 RNA 分子由长度约 64~303 nt 的前体(pre-miRNA)加工而成,而 pre-miRNA 则由更长的 pri-RNA 加工生成。miRNA 是一类非常重要的转录后调控因子,在很多生物过程中起重要的调控作用。随着 miRNA 在不同生物中的大量发现,对其功能的研究已引起人们的极大兴趣<sup>[2]</sup>。

已有文献报道有些 miRNA 与植物体发育有关<sup>[3]</sup>,例如:pri-miR160 响应 SA 下调,但由于赤霉素,乙烯和茉莉酸甲酯正调控,从而影响龙眼的胚乳发育,表明 pri-miR160 与激素转导有关<sup>[4]</sup>。在拟南芥中,miR167 及靶基因 *ARF4* 和 *ARF8* 受蓝光调控降低莲座叶数和叶面积,减少干物质生成,影响植株的生长发育<sup>[5]</sup>。miR393 影响外源 2,4-D 对初级根的生长,同时 miR393 的过表达抵消铝诱导的根伸长抑制和减轻活性氧(ROS)诱导的细胞死亡<sup>[6]</sup>。近年来发现一些 miRNA 能够参与花色素苷代谢。据报道,苹果、番茄、葡萄、丹参中 miR159,miR319 和 miR828 家族也可以调控 MYB 转录因子<sup>[7]</sup>。拟南芥 miR156 和 miR529 通过 5' RACE 试验验证其与靶基因 *SPL9* 和 *SPL15* 的剪切方式,通过抑制靶基因 *SPL9* 和 *SPL15* 的表达,参与花色素苷代谢的调控<sup>[8]</sup>。在荔枝中,miR156 的靶基因为 *SPL* 家族中的 *SPL1/2*,使用酵母双杂交和 BiFC 分析表明 LcSPL1 蛋白可与 LcMYB1 蛋白相互作用,而 LcMYB1 是荔枝花色素苷生物合成中的关键调控基因<sup>[9]</sup>,从而证实 miR156-*SPLs* 模块在荔枝花色素苷生物合成的作用。

miR160a 是一个高度保守的 miRNA,在水稻中,miR160a 抑制其靶基因 *ARF18*,导致水稻的异常生长和发育<sup>[10]</sup>。miR160a-*ARFs* 受生长素调节,主要参加激素代谢通道,施加外源生长素,ARF 感知到生长素后,通过结合其调控区中的生长素应答元件(AuxRE)来激活或抑制大量生长素应答基因的表达。在拟南芥中,ARF18 受外源生长素的正调控<sup>[11-13]</sup>。miR160a-*ARFs* 模板在花色素苷代谢通道上的研究甚少,因此本研究通过对观赏海棠‘王族’中 miR160a 的前体进行克隆,并将其过表达载体瞬时转入‘王族’组培苗中,通过对花色素苷含量及花色素苷代谢途径关键基因的表达量进行分析,探究观赏海棠中 miR160a 对花色素苷代谢途径的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验过程中所用材料为 2018 年春天采集的北

京农学院东大地海棠资源圃自然生长的观赏海棠常色红叶品种‘王族’和北京农学院组培中心的‘王族’组培苗。采后迅速用液氮速冻,存于-80℃备用。

瞬时侵染试验采用北京农学院组培中心保存的海棠‘王族’。组培苗培养在 MS 培养基中培养(30%蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.4 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA;pH 5.8~6.0)。培养条件:温度 23℃±1℃,相对湿度:70%~75%,光照强度:1 800 Lx,光照时间:长日照光照(16 h 光/8 h 暗)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 植物总 RNA 的提取及 cDNA 的反转录 植物材料总 RNA 提取采用艾德莱 EASY spin 多糖多酚植物 RNA 快速提取试剂盒(RN3802),提取‘王族’叶片中总 RNA,采用全式金两步法 RT-PCR 试剂盒(AT401-01)。

1.2.2 *McmiR160a* 前体的克隆 由于苹果和海棠高度同源,使用 NCBI 找到苹果的 *MdmiR160a* 的基因信息,可知该序列所在基因组的染色体,是在 10 号染色体上的 NC\_024248.1 位置,然后前体序列的上游取 200~250 bp,下游取 200~250 bp,加上前体序列本身构成一段 400~500 bp 左右的基因序列。通过 Primer5 设计正向引物 *McmiR160a*-F: 5'-CTTGGATTGAAGGGAGCTC-3'; 反向引物 *McmiR160a*-R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。以‘王族’叶片 cDNA 为模板,反应体系为:cDNA 模板 2 μL、miR160a-F 1 μL、miR160a-R 1 μL、2×EasyPfu PCR SuperMix 25 μL、ddH<sub>2</sub>O 1 μL,反应条件为:95℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 40 s,35 个循环,72℃ 10 min,4℃ 保存。

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶检测,目的条带正确的基因片段用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(博迈德:DH101-1)进行胶回收,回收后的目的基因产物连接至 pEASY-Blunt 载体上,进行涂板、转入大肠杆菌、挑选阳性克隆后测序。

1.2.3 *McmiR160a* 前体过表达载体的克隆 将测序正确的质粒与过表达质粒 pCAMBIA1300-eGFP 用限制性内切酶 QuickCut *Xba*I(TAKARA:1634)和 QuickCut *kpn*I(TAKARA:1618)双酶切,酶切体系为目的基因/载体 10 μL/15 μL、QuickCut™ *Xba*I 1 μL、QuickCut™ *Kpn*I 1 μL、10×QuickCut buffer 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 补充到 50 μL,得到 DNA 小片段和质粒大片段,将目的基因、载体与 T4DNA 连接酶(TAKARA:2011A)轻轻混匀,离心后进行金属浴 4℃ 连接过夜(16~24 h),连接体系为:载体 DNA

50 ng、插入 DNA 片段 150 ng、T4 DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$ 、T4 DNA 连接酶缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 补充到 20  $\mu\text{L}$ ，然后转入大肠杆菌 trans T1，送博迈德公司测序。将测序正确的质粒-20℃保存，并将测序正确的大肠杆菌加入 50%甘油 1:1 混匀后液氮速冻之后于-80℃保存。

#### 1.2.4 *McmiR160a* 的瞬时转化

采用农杆菌冻融法将 2  $\mu\text{L}$  质粒 DNA 转入 50  $\mu\text{L}$  刚刚融化的农杆菌感受态 GV3101 细胞(实验室留存)中。培养并挑取单菌落进行 PCR 鉴定，正确的菌液进行大量培养后收集农杆菌菌体，加入侵染液(10 mmol/L MES+10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>+200  $\mu\text{mol/L}$  AS+无菌水)调菌液 OD 值到 0.8~1.0 左右。取继代培养 20~25 d 左右的生长良好无损伤褐化的‘王族’组培苗，采用真空抽吸的方法将菌液转入组培苗中，

条件为 0.5 Mpa 持续 30~40 s 后，快速放气；至 0.3 Mpa 后，缓慢放气；至 0.2 Mpa 后，缓慢放气。然后用滤纸吸干组培苗表面的液体后，接种于固体培养基(MS 培养基+头孢 300 mg/L+卡那霉素 50 mg/L)上，组培室中培养 7~10 d 后观察表型。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 参照 SYBR © Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂(购自大连宝生物工程有限公司)使用说明书，采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)两步法(95℃预变性 3 min, 94℃变性 20 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 40 次循环)，以 18S 作为参照基因，所用所有荧光引物见表 1，检测花色苷合成途径相关的转录因子和生物合成基因的相对表达量。待测样品的数据均进行 3 次生物学重复。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因 Genes		引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	产物长度 Product length/bp
qCHS	Forward	GTGACTGTCCAGGAAGTTCGC	143
qCHS	Reverse	GCACACACTTGGATTCTCCTTTAG	143
qANS	Forward	GAGAAGTATGCCAATGACCAGG	200
qANS	Reverse	GGCGGTTGCCTCAATGTAAT	200
qDFR	Forward	CCGAGTCCGAATCCGTTTGT	126
qDFR	Reverse	CCTTCTTCTGATTCTGTTGGGT	126
qMYB10	Forward	GGCGCATGATCTTGGCGACAGT	171
qMYB10	Reverse	ACGCCACCACAAACGTCGTCG	171
qARF18	Forward	ATGGCGGCGGGTTCTCTGTC	150
qARF18	Reverse	GCGGCGTCCCTCTGTAATG	150
miR160a	Forward	GCCTGGCTCCCTGTATG	563
miR160a	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	563
XbaI-miR160a	Forward	GCTCTAGAGAGGATCCCTCTCAAAGCA	581
miR160-KpnI	Reverse	CGGTACCCACCAAGTGCGTAGATGTGCC	581

1.2.6 HPLC 法测定花色苷含量 将组培苗叶片在液氮下磨成细粉，称取 1 g 粉末加入 1 mL 花色苷提取液(体积比是甲醇:甲酸:水=80:1:19)，之后在 45℃的水浴中超声提取 60 min(注意先预热到 45℃)。将提取的所述花色苷提取液进行纯化处理，使用离心机(12 000 r/min)离心 10 min，得到上清液后，使用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜对上清液进行过滤，并将剩余的滤液在-20℃冰箱中保存备用。将过滤后的上清液装于液相上样瓶中用于 HPLC 检测；对上样瓶进行 HPLC 检测，检测条件：样品温度 15℃；柱温 40℃；流速 0.5 mL/min；进样量 0.4  $\mu\text{L}$ ；流动相梯度，其中流动相 A 采用 0.1%(体积比)甲酸水；流动相 B 采用色谱纯乙腈：0 min 10% B, 4.5 min 19% B, 9.5 min 32% B; 10.5 min 35% B;

11.5 min 65% B; 14 min 95% B; 柱子平衡时间 1 min; 平衡: 14 min 95% B; 15 min, 10% B。检测波长: 520 nm, 350 nm; 280 nm(甲酸、乙腈均为 100% 色谱纯，用水为 18.2 mol/L 去离子水)。

1.2.7 *McmiR160a* 的靶基因预测 通过靶基因预测网站 psRNATarget ([http://plantgrn.noble.org/v1\\_psRNATarget/](http://plantgrn.noble.org/v1_psRNATarget/))对 *McmiR160a* 的靶基因进行预测，通过 NCBI 比对，找到该基因的详细描述。

## 2 结果与分析

### 2.1 *McmiR160a* 前体的克隆和过表达载体的构建

以观赏海棠常色红叶品种‘王族’叶片 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增后得到长度为 563 bp 的 *McmiR160a* 前体序列(引物序列见表 1)，经过

1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的片段进行胶回收后连接到 pEASY-Blunt 载体上,进行蓝白斑筛选挑取阳性克隆进行测序,将测序正确的质粒与过表达载体 pCAMBIA1300 用限制性内切酶 *Xba*I 和

*Kpn*I 双酶切,并连接转化,将鉴定正确的质粒进行测序,得到 *McmiR160a* 过表达载体 (OEmiR160a),测序结果如图 1 所示。

McmiR160a	GAGGATCCCTCTCAAAGCAAATTGCATTCAAATACATGTACTGTACATGGAAAGAAAATCTCTCCACTCATACTAGGCCGATGGCAC	90
OEmiR160a	GAGGATCCCTCTCAAAGCAAATTGCATTCAAATACATGTACTGTACATGGAAAGAAAATCTCTCCACTCATACTAGGCCGATGGCAC	121
McmiR160a	TATATATATGGAGAGTTCACACATCACTTCTGTCTTCATATACTCTGCCCCACCTCTACCCACCTCCACTCTCTCCTGAGTTTTTCTT	180
OEmiR160a	TATATATATGGAGAGTTCACACATCACTTCTGTCTTCATATACTCTGCCCCACCTCTACCCACCTCCACTCTCTCCTGAGTTTTTCTT	211
McmiR160a	TGAAAGTACGTTTCTATGGCGATCAATGAGGAAGCTTGCCTTGGGCGTGGAGGCTGCAGCAAAGGTGACTTGGGTTATGCCTGGCTCCC	270
OEmiR160a	TGAAAGTACGTTTCTATGGCGATCAATGAGGAAGCTTGCCTTGGGCGTGGAGGCTGCAGCAAAGGTGACTTGGGTTATGCCTGGCTCCC	301
McmiR160a	TGTATGCCACAAGCAGAAGTTCAATTTCTTGATTGGCTATTTGTTGGTGGCGTACAAGGAGCCAAAGCATACTATCTCTTTTCTTTTAGTC	360
OEmiR160a	TGTATGCCACAAGCAGAAGTTCAATTTCTTGATTGGCTATTTGTTGGTGGCGTACAAGGAGCCAAAGCATACTATCTCTTTTCTTTTAGTC	391
McmiR160a	GTCTTGCATTCTGCTTTTGCCTTGCACATATAAGATTAAGTTCTTTGGTGGCCATATTTGAATCACCTTCACCCACTTGCCTGGTGCACGC	450
OEmiR160a	GTCTTGCATTCTGCTTTTGCCTTGCACATATAAGATTAAGTTCTTTGGTGGCCATATTTGAATCACCTTCACCCACTTGCCTGGTGCACGC	481
McmiR160a	ATATGCTTTTCATAGACAATACTTGAGTGAATTAAGTGGTGGTATCATCTCAATTGACCTCATAATATCGTGTGATCTCTCTAACGAAG	540
OEmiR160a	ATATGCTTTTCATAGACAATACTTGAGTGAATTAAGTGGTGGTATCATCTCAATTGACCTCATAATATCGTGTGATCTCTCTAACGAAG	571
McmiR160a	TGAGGCACATCTACGCACCTTGGT	563
OEmiR160a	TGAGGCACATCTACGCACCTTGGT	594

图 1 *McmiR160a* 过表达载体序列比对  
Fig. 1 Sequence alignment of expression vector *McmiR160a*

2.2 *McmiR160a* 的靶基因预测

通过靶基因预测网站 psRNATarget 对 *McmiR160a* 的靶基因进行预测分析,得到与 *McmiR160a* 高度互补的并且假阳性较低的靶基因 *ARF18*,其 *McmiR160a* 互补性如图 2 所示,可以看出只有在第一个碱基处有错配。将其比对到苹果基因组中的 NCBI 上,其在 NCBI 上的序列号为 LOC103423002,属于 ARFs 家族,具有相对保守的结构,即包含一个保守的 B3 DNA 结构域,ARF 结构域和 Aux/IAA 结构域。

	1352		1373
LOC103423002	5'	-AGGCATACAGGGAGCCAGGCA-	3'
		:	
miR408a	3'	-CGGUCCCUUCUCCGUCACGUA-	5'
	21		1

图 2 *McmiR160a* 与 *ARF18* 互补性分析  
Fig. 2 Complementary Analysis of *McmiR160a* and *ARF18*

2.3 *McmiR160a* 的瞬时遗传转化

将 *McmiR160a* 过表达载体通过农杆菌转化法瞬时转入‘王族’组培苗,培养室中培养 7~10 d 观察表型,与对照相比,过表达 *McmiR160a* 转基因组培苗明显呈现绿色的表型(图 3)。通过荧光检测后取样,对瞬时过表达 *McmiR160a* 植株中花色素苷

含量进行测定,过表达植株中花色素苷含量明显低于对照组。对瞬时过表达 *McmiR160a* 植株中靶基因 *ARF18* 和花色素苷合成途径中的关键基因 *CHS*、*ANS*、*DFR*、*MYB10* 的相对表达量进行测定,过表达 *McmiR160a* 后,其靶基因 *ARF18* 的表达量下降,花色素苷合成关键基因的表达量都显著降低。说明 *McmiR160a* 可以负调控观赏海棠中花色素苷的生物合成(图 4)。

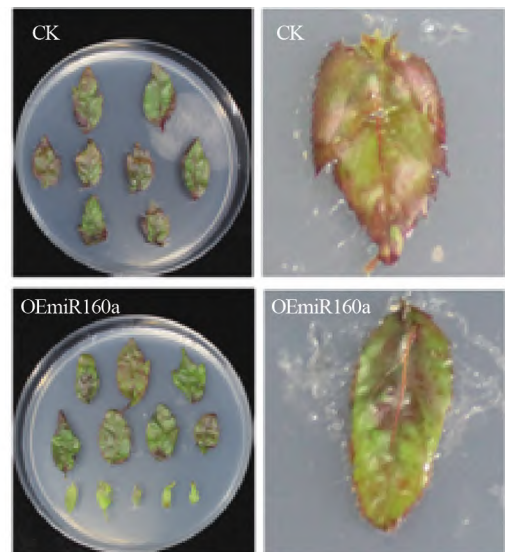


图 3 *McmiR160a* 过表达表型图  
Fig. 3 Phenotypic of OEmiR160a plants

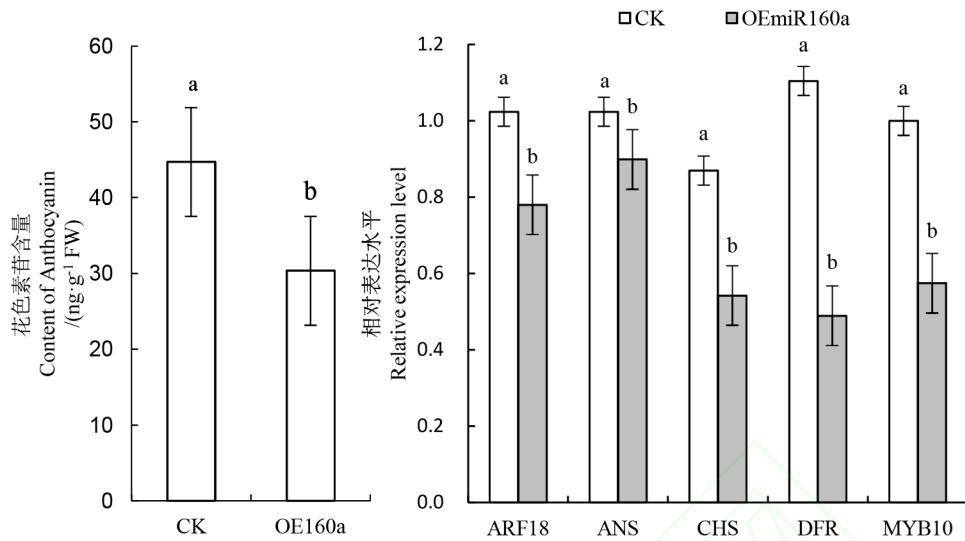


图4 *McmiR160a* 瞬时过表达植株中花色苷含量及其结构基因表达

Fig. 4 Anthocyanin content and relative expression level of key genes in OEmiR160a plants

### 3 讨论

近年来,miRNAs在参与植物生长发育以及应激环境胁迫等方面已有很多的研究进展。高蔗糖诱导的 *miR398* 以及 *miR408* 被高铜消除,这种蔗糖调节的铜处理是取决于 *SPL7* 的存在<sup>[14]</sup>。*miR156* 通过靶基因 *SPL3* 调控 *PHT1;5* 或者诱导根际酸化作用参与 P 缺乏时的代谢调控<sup>[15]</sup>。而花色苷不仅对植物组织的呈色,应对外界胁迫至关重要,同时还是一种重要的抗氧化物质,miRNAs 对花色苷以及植物生长发育发挥重要作用。

*miR160* 在苹果中高度保守,其在 miRbase 数据库中收录的 *miR160* 前体有 5 种: *miR160a*、*miR160b*、*miR160c*、*miR160d*、*miR160e*。本研究主要通过常在色红叶观赏海棠‘王族’中进行 *miR160a* 的前体克隆,得到 563 bp 的前体序列,并通过双酶切的方式构建过表达载体 pCAMBIA1300-*miR160a*,瞬时转入‘王族’组培苗中。使用 HPLC 法对转基因组培苗进行花色苷含量测定,使用 qRT-PCR 对转基因组培苗进行花色苷结构基因 *CHS*、*ANS*、*DFR*、*UFGT* 及转录因子 *MYB10* 的表达量进行测定。发现 *miR160a* 对花色苷有着负调控作用。miRNAs 主要是通过下游靶基因的剪切抑制来发挥作用,*miR160a* 的靶基因 *ARF18*,属于生长素调节因子,主要参与激素代谢通路。在番茄中,*miR160* 的主要靶标 *SlARF10a*,调节生长素介导的花器官脱落和侧向器官叶片生长<sup>[16]</sup>。而花色苷的调节受到各种激

素的影响,其中包括生长素。在拟南芥中,施用 3 种外源生长素 (IAA, NAA, 2, 4-D),调节转录因子 *TT8*、*GL3* 和 *PAP1* 的表达以及花色苷生物合成途径中的基因如 *DFR* 的表达来控制花色苷的生物合成<sup>[17]</sup>。同时 *ARF18* 受外源生长素的正调控,因此 *ARF18* 可能对花色苷有积极调控作用。本研究结果对 *miR160a* 及靶基因 *ARF18* 对花色苷的具体调控作用提供一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Honda T, Saito N. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigment[J]. Heterocycles, 2002,56:633-692
- [2] 黄爱优.三角褐指藻 miRNA 筛选作用机制及代谢流量分析[D].北京:中国科学院大学,2013
- [3] 陈雪姣.调控 miRNA 的活性小分子的发现和作用机制研究[D].南京:南京大学,2013
- [4] Lin Y, Lai Zhx, Tian Q, Lin Lx, Lai R, Yang Mm, Zhang Dm, Chen Yk and Zhang Zh. Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of ARF10, -16, and -17 cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour[J]. Frontiers in plant science, 2015,6:956
- [5] Pashkovskiy PP, Kartashov AV, Zlobin IE, Pogosyan SI, Kuznetsov VV. Blue light alters miR167 expression and microRNA-targeted auxin response factor genes in *Arabidopsis thaliana* plants[J]. Plant physiology and biochemistry, 2016, 104:146-154
- [6] Bai B, Bian H, Zeng Z, Hou N, Shi B, Wang J, Zhu M, Han N. miR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in Barley[J]. plant and cell physiology. 2017, 58(3):426-439

- [7] Xia R, Zhu H, An YQ, Beers EP, Liu Z. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks[J]. *Genome biology*, 2012,13(6):R47
- [8] Morea EG, Valente GT, Nogueira FT. Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants[J]. *BMC Plant Biology*, 2016,16(1):40
- [9] Liu R, Lai B, Hu B, Qin Yh, Hu1 Gb, Zhao Jt. Identification of microRNAs and their target genes related to the accumulation of anthocyanins in *Litchi chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. *Frontiers in plant science*, 2017,7:2059
- [10] Jian H, Zhiyong L, Dazhong Zh. Deregulation of the Os-miR160 Target Gene OsARF18 Causes Growth and Developmental Defects with an Alteration of Auxin Signaling in Rice [J]. *Science Report*, 2016,6:29938
- [11] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999,96(10):5844-5849
- [12] Wang S, Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T J. AUXIN RESPONSE FACTOR7 restores the expression of auxin-responsive genes in mutant *Arabidopsis* leaf mesophyll protoplasts [J]. *Plant Cell*, 2005,17(7):1979-1993
- [13] Boer DR, Freire-Rios A, van den Berg WA, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, López-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, de Vries SC, Solano R, Weijers D, Coll M. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors[J]. *Cell*, 2014,156(3):577-589
- [14] LigangR, GuiliangT. Identification of sucrose-responsive microRNAs reveals sucrose-regulated copper accumulations in an SPL7-dependent and independent manner in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2012,187:59-68
- [15] Lei KJ, Lin YM, An GY. miR156 modulates rhizosphere acidification in response to phosphate limitation in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Research*, 2016,129(2):275-284
- [16] Damodharan S, Zhao D, Arazi T. A common miRNA160-based mechanism regulates ovary patterning, floral organ abscission and lamina outgrowth in tomato [J]. *the Plant Journal*. 2016,86(6):458-471
- [17] Zhong L, MingZhu S, DeYu X. Regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* red pap1-D cells metabolically programmed by auxins [J]. *Planta*, 2014, 239 (4): 765-781