**开题报告**

1．研究现状及发展态势

MicroRNAs(miRNAs)是真核生物中一类非编码内源小分子RNA (一般为19-24nt)，首先在线虫中被发现。植物中最早被报道的miRNA是在拟南芥中发现的。2002年，Reinhart等在拟南芥幼苗和花样本中分离克隆小分子的RNA，发现并命名了16个miRNA，即miR156至miR171[1]。近年的研究表明，植物很多生命过程受miRNA调控，如生长发育、信号转导、抗逆性等。植物受环境因素变化的影响，其miRNA表达量会随环境因素变化而改变，miRNA通过调控其靶基因表达，使植物在生理与形态上产生对环境的适应性[2]。

miR172是通过调节AP2-like转录因子表达参与调节植物开花时间与花器官形成的一类重要miRNA。miR172靶基因是AP2类转录因子，他们都是FL（Flowering Locust）基因的转录抑制子。AP2是ABC模型中的A类同源异型基因，在花发育早期，miR172在SAM中积累，抑制AP2，阻止花分生组织的形成[3]。在模式植物拟南芥中，miR172在转录和翻译上抑制其靶基因APETALA2作用的发挥，从而参与到花器官的形态发生。miR172还可以通过调控靶基因TOE1、TOE2、TOE3控制开花时间的早晚[4]。在水稻中，miR172家族有4个成员（OsmiR172a-d），分别位于水稻基因组第9、1、7、2染色体上[5]。近期的研究发现，OsmiR172a可以通过AP2调控水稻瘟病抗性[6]。

水稻OsmiR172是否与水稻的发育、株型、抗逆性等相关，尚无研究报道。本研究利用基因定向编辑系统创制水稻OsmiR172的突变体并进行鉴定。为研究其功能提供材料基础。

2．选题依据及意义

近期对OsmiR172的研究表明，OsmiR172可以通过调节其靶基因AP2，对水稻的花期、抗逆性等多个方面进行调控。如OsmiR172负调控水稻花向小穗的转变，通过靶向AP2家族的基因调控水稻的穗分支，其过表达会使小穗数目变少[7]。OsmiR172b参与调控水稻的花序发育与花序起始发育的时相转换，其过表达会导致花卉和种子发育缺陷 [8]。OsmiR172a可以通过AP2调控水稻瘟病抗性[6]。

通过PCR-SSCP方法对突变体初筛，再通过Sanger测序对OsmiR172定向敲除突变体进行具体的鉴定分析，可以为深入研究OsmiR172生物功能提供可靠突变体材料。

3．课题研究内容

通过利用SSCP、Sanger测序对水稻OsmiR172定向敲除突变体的鉴定分析，筛选得到OsmiR172a、OsmiR172b、OsmiR172c、OsmiR172d单突变体及OsmiR172ad、OsmiR172bc、OsmiR172abcd等多突变体。

4. 拟解决的关键问题和最终目标，以及拟采取的主要理论、技术路线和实施方案等：

首先，突变体的分离鉴定。本文拟通过PCR-SSCP方法进行分离。先通过PCR扩增靶序列，然后将扩增产物变性为单链，进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时，DNA单链的迁移率除与DNA链的长短有关外，更主要的是取决于DNA单链所形成的构象。在非变性条件下，DNA单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象。这种构象由DNA单链碱基决定，其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用来维持。相同长度的DNA单链其顺序不同，甚至单个碱基不同，所形成的构象不同，电泳迁移率也不同。PCR产物变性后，单链产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳，靶DNA中含单碱基置换，或数个碱基插入或缺失等改变时，因迁移率变化会出现泳动变位，从而可将变异DNA与正常DNA区分开。

此后，通过Sanger测序分析突变体的基因型。Sanger方法利用DNA聚合酶来延伸结合在待定序列模板上的引物，直到结合了ddNTP为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构成，每个反应含有所有四种dNTP，并混入限量的一种不同的ddNTP。由于ddNTP缺乏延伸所需要的3-OH基团，使延长的寡聚核苷酸选择性地在G、A、T或C处终止。终止点由反应中相应的双脱氧核苷酸而定。四次反应分别确定G、A、T、C的位置，结合四次反应，就可以得到这段DNA的碱基序列。

通过利用SSCP、Sanger测序对水稻OsmiR172定向敲除突变体的鉴定分析，可以筛选出OsmiR172a、OsmiR172b、OsmiR172c、OsmiR172d单突变体及OsmiR172ad、OsmiR172bc、OsmiR172abcd等多突变体，及其具体突变情况。

5．论文特色或创新点

本课题通过SSCP、Sanger测序对OsmiR172定向突变体进行具体的鉴定分析，筛选出OsmiR172单突变体与多突变体，能够为进一步研究水稻OsmiR172提供可靠材料，对水稻OsmiR172功能研究有重要帮助。

参考文献：

[1] Reinhart, B. J. MicroRNAs in plants[J]. Genes & Development, 16(13):1616-1626.

[2]黄俊骏,刘文文,郭亚如,蒋天慧,任晴,王华华,梁卫红.microRNA在植物生长发育中的研究进展[J].生物技术通报,2019,35(11):141-149.

[3] Li Zhao, YunJu Kim, Theresa T. Dinh,等. miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems[J]. Plant Journal, 2007, 51(5):840-849.

[4]李文静,王杏茹,刘涛,陈冰星,赖钟雄,郭容芳.芥蓝miR172家族成员进化特性比较及时空表达分析[J].西北植物学报,2018,38(08):1443-1450.

[5]郭西贵. 水稻miR172基因遗传转化及其功能分析[D].浙江师范大学,2012.

[6]马晓春. Osa-miR172a通过AP2调控水稻稻瘟病抗性[C]. 中国植物病理学会.中国植物病理学会2019年学术年会论文集.中国植物病理学会:中国植物病理学会,2019:450.

[7] Wang L , Sun S , Jin J , et al. Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(50):15504-15509.

[8] Zhu Q H , Upadhyaya N M , Gubler F , et al. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (Oryza sativa)[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1):149-0.