

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2021.04.001

水稻低温胁迫响应 microRNA 鉴定

罗 樊¹, 周建平², 雷万喜¹, 谭峻文¹, 郭亚冲², 全 泉², 蔡光泽^{1*}

(1.攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室,四川 西昌 615013;
2.电子科技大学生命科学与技术学院,四川 成都 610054)

摘要:水稻是世界三大粮食作物之一,然而低温胁迫会严重抑制水稻的生长发育。为了探究 microRNA 在水稻低温胁迫中的作用,采用低温处理前、5 ℃低温处理 24 h 和 5 ℃低温处理 48 h 的 2~3 叶期水稻整株,构建 9 个小 RNA 文库。通过高通量测序后,对 9 个小 RNA 文库的 microRNA 进行差异表达分析,一共筛选出 21 个与冷胁迫相关的 microRNA,其中 16 个在冷胁迫下上调,5 个在冷胁迫下下调。通过对这 21 个 microRNA 靶基因的 GO 富集结果表明,其靶基因广泛富集在包括信号转导、免疫系统和物质合成等细胞内过程中。这表明水稻可能通过多种 microRNA 介导,从各个方面来协同抵御低温胁迫。本研究为进一步阐明 microRNA 响应低温胁迫的分子机制提供了基础,且本研究所鉴定的 microRNA 为增强水稻对低温耐受性遗传改良提供了优异的 miRNA 资源。

关键词:水稻;低温胁迫;small RNA 测序;microRNA

中图分类号:Q943.2;S511 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2021)04-0001-05

Identification of Rice's MicroRNA in Response to Low Temperature Stress

LUO Fan¹, ZHOU Jianping², LEI Wanxi¹, TAN Junwen¹, GUO Yachong²,
QUAN Quan², CAI Guangze^{1*}

(1.Panxi Crop Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Xichang, Sichuan 615013, China; 2.School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054, China)

Abstract: Rice is one of the three major food crops in the world. However, low temperature stress will seriously inhibit the growth and development of rice. In order to explore the role of miRNA in rice under low temperature stress, nine small RNA libraries were constructed by taking the whole plant of 2 ~ 3 leaf rice before low temperature treatment, 5 ℃ low temperature treatment for 24 hours and 5 ℃ low temperature treatment for 48 hours. Through high-throughput sequencing and differential expression analysis of miRNAs in 9 small RNA libraries, 21 miRNAs related to cold stress were screened, of which 16 were up-regulated and 5 were down regulated under cold stress. The GO enrichment results of these 21 miRNA target genes showed that their target genes were widely enriched in intracellular processes including signal transduction, immune system and substance synthesis. This suggests that rice may cooperate to resist low temperature stress through a variety of miRNAs. The results of this study provide a basis for further elucidating the molecular mechanism of miRNA response to low temperature stress, and the miRNA identified in this study provides excellent miRNA resources for enhancing the genetic improvement of low temperature tolerance in rice.

Keywords: rice; low temperature stress; small RNA sequencing; microRNA

0 引言

低温胁迫是植物正常生长的主要限制因素之

一,特别是热带和亚热带水稻作物,在其生长过程中经常遇到低温,导致低温冷害,具体表现为:在芽期遭受低温会导致种子发芽率降低,生长发育延缓

收稿日期:2021-09-09

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(31960423);四川省应用基础研究项目(2018JY0260);西昌学院“两高”人才项目(LGLZ201818)。

作者简介:罗樊(1989—),男,四川简阳人,讲师,博士,研究方向:作物遗传育种。*通信作者:蔡光泽(1963—),男,四川巴中人,教授,学士,研究方向:作物栽培学。

甚至停止;而苗期遭受低温会导致叶片枯黄,分蘖数减少,根系受损,严重时还会造成其生长发育减缓或死亡,进而导致减产,甚至绝收;而减数分裂期遭遇低温会导致花粉败育,从而影响正常开花受粉,导致结实率下降;开花期遇低温会导致花药开裂不正常或者花粉萌发受精异常,从而造成结实率下降;灌浆期遭受冷害会造成物质运输功能受损,从而导致水稻籽粒灌浆不饱满,降低品质和产量。发生在水稻任何时期的低温冷害都会破坏性地降低其产量^[1-3]。因此,解决水稻冷害问题对于中国乃至世界的粮食安全具有极其重要的现实意义。

microRNA(miRNA)是真核生物中一类长度 19~24 nt 的非编码的内源性小分子 RNA。它主要通过剪切降解、抑制翻译、染色质重塑(甲基化)等方式调控其靶基因的表达水平^[4-5]。大量的研究表明:miRNA 在植物应对非生物胁迫方面起着至关重要的作用^[6-10],如温度^[11]、盐^[12-13]和干旱^[14]胁迫等。

到目前为止,一些参与水稻低温调控的 miRNAs 已经分离鉴定出来。Yang 等^[15]和 Wang 等^[16]发现 miRNA319 通过对靶基因 OsPCF6 和 OsTCP21 的调控,从而增强水稻耐寒性。Sun 等^[17]发现 OsmiR535 在冷应激反应中的负调节功能,OsmiR535 的过度表达通过影响渗透调节以及 ROS 的积累和清除加剧了低温诱导的细胞死亡。Zhou 等^[18]发现 OsmiR156 通过靶向 OsSPL3 提高冷应激耐受性。另外,Sun 等^[19]发现 miR408 也与低温胁迫密切相关。

本研究以水稻品种日本晴为材料,通过高通量测序技术测定日本晴在低温处理前、低温处理 24 h 和低温处理 48 h 的 miRNA 表达量,鉴定出与水稻低温响应的 miRNA,为水稻低温耐受性的遗传改良提供优良的 miRNA 资源。

1 材料与方法

1.1 材料和试验设计

将水稻品种日本晴种子播种到钵钵里,每钵 100 粒,在室温条件下育苗至 2~3 叶期,然后在光照培养箱中设置温度为 5℃,光照周期 12 h(光照)+12 h(黑暗)条件下进行低温处理。对照组(CK)在 2~3 叶期不进行低温处理,处理组 1(T1)在 2~3 叶期低温处理 24 h,处理组 2(T2)在 2~3 叶期低温处理 48 h。CK, T1 和 T2 各包含 3 个生物学重复,CK 的 3 个重复分别用 CK-1, CK-2 和 CK-3 表示;T1 的 3 个重复分别用 T1-1, T1-2 和 T1-3 表示;T2 的 3 个重复分别用 T12-1, T2-2 和 T2-3 表示。然后

分别取其全株进行 miRNA 转录组测序。

1.2 miRNA 文库构建和测序

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)提取每个样本的总 RNA。在 15%PAGE 凝胶上通过大小分级从总 RNA 中分离出 miRNA,并从凝胶中纯化出长度为 18~30 nt 的 RNA 分子。将 5'和 3'端接头连接到 miRNA 分子上,通过 PCR 对连接的 RNA 进行反转录和扩增,从而完成 9 个 miRNA 文库的构建。最后,在北京百迈客生物科技有限公司的 Illumina HiSeq2500 分析仪上对构建的 9 个 miRNA 文库进行测序。

1.3 数据过滤和读取

在测序完成后,首先对原始 reads 进行质量控制,去除<18 或>30 个核苷酸的序列、无法识别的碱基质量分数≥10%的 reads、没有 3'端接头序列的 reads,再剪切掉 3'端的接头序列,从而获得高质量序列(Clean Reads)。然后利用 Bowtie 软件,将 Clean Reads 分别与 Silva 数据库、GtRNAdb 数据库、Rfam 数据库和 Rfam 数据库进行序列比对,通过过滤核仁小 RNA(snoRNA)、转运 RNA(tRNA)、核内小 RNA(snRNA)、核糖体 RNA(rRNA)等 ncRNA 以及重复序列,从而获得含有 miRNA 的 Unannotated reads。然后将筛选出的 Unannotated reads 通过 Bowtie 软件与水稻参考基因组进行对比,分析其在水稻参考基因组(Oryza_sativa.MSU_v7.0)上的表达和分布。

1.4 miRNA 鉴定、差异表达分析和 KEGG 通路富集分析

在已知 miRNA 鉴定方面,将比对到参考基因组中的 reads 和 miRBase(v22)数据库中已知 miRNA 成熟序列及其下游 5 nt 与上游 2 nt 的范围进行序列比对,不超过一个错配的 reads 被认为是已知 miRNA。在新 miRNA 的预测方面,使用 miRDeep2 软件,通过所获得的 reads 比对到基因组上的位置信息来获得可能的前体序列,再基于 reads 在前体序列上的分布信息(基于 miRNA 产生特点, mature, star, loop)和前体结构能量信息(RNAfold randfold),通过贝叶斯模型进行打分,最终实现新 miRNA 的预测。利用 DESeq2_EBSeq 软件筛选 $P \leq 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$ 条件下的差异表达 miRNA。并对筛选出的差异表达 miRNA 进行 GO 富集和 KEGG 代谢通路分析。

2 结果与分析

2.1 sRNA 序列分析

为了探究 miRNA 在水稻低温胁迫调控中的机

制,分别将 2~3 叶期 CK、T1 处理、T2 处理的水稻分别全株进行小 RNA 测序。使用 Illumina 测序技术,分别在 CK、T1 和 T2 的小 RNA 文库中获得 68 384 421, 129 627 361 和 128 834 722 条 raw

reads。经过对 raw reads 过滤后,单个样品的 clean reads 比率、Mapped_Reads 比率、Q20、Q30 和 GC 的质量分数分别在 29%、37%、98%、96% 和 51% 以上(表 1)。

表 1 小 RNA 注释分类

样品编号	碱基总数/ nt	原始测序/ nt	过滤后的 reads	总 reads	比对上的 reads (占比)	比对到正链的 reads(+) (占比)	比对到负链的 reads (占比)	新 miRNA/ 所有鉴定到 miRNA(占比)	GC/ %	Q20/ %	Q30/ %
CK-1	1 014 789 279	19 897 829	10 533 402	5 164 541	2 371 639 (45.92%)	1 778 456 (34.44%)	593 183 (11.49%)	240/707 (33.95%)	52.21	99.18	97.38
CK-2	861 164 784	16 885 584	11 478 966	5 524 573	3 490 972 (63.19%)	2 907 259 (52.62%)	583 713 (10.57%)	238/661 (36.01%)	51.69	99.25	97.48
CK-3	1 611 651 408	31 601 008	14 080 288	6 584 612	4 165 542 (63.26%)	3 388 252 (51.46%)	777 290 (11.80%)	236/675 (34.96%)	52.39	99.08	96.95
T1-1	2 983 983 276	58 509 476	18 195 478	8 780 355	4 495 036 (51.19%)	3 584 323 (40.82%)	910 713 (10.37%)	239/739 (32.34%)	52.33	99.13	97.24
T1-2	1 205 885 055	23 644 805	12 096 564	5 740 003	2 714 566 (47.29%)	1 976 745 (34.44%)	737 821 (12.85%)	239/720 (33.19%)	51.8	98.77	96.7
T1-3	2 421 127 080	47 473 080	15 637 033	7 214 048	3 863 599 (53.56%)	3 169 315 (43.93%)	694 284 (9.62%)	240/705 (34.04%)	53.23	99.23	97.35
T2-1	1 853 173 740	36 336 740	14 151 466	6 154 519	2 321 523 (37.72%)	1 827 141 (29.69%)	494 382 (8.03%)	239/695 (34.39%)	52.45	99.21	97.18
T2-2	2 123 009 334	41 627 634	15 221 244	6 978 681	3 832 016 (54.91%)	2 979 239 (42.69%)	852 777 (12.22%)	240/738 (32.52%)	52.63	98.99	96.69
T2-3	2 594 387 748	50 870 348	14 839 504	6 707 597	3 708 646 (55.29%)	3 174 095 (47.32%)	534 551 (7.97%)	233/684 (34.06%)	52.48	99.17	97.15

经过对测序中的小 RNA 进行鉴定,分别在 CK、T1 和 T2 鉴定出 755, 778 和 784 个 miRNA, 其中 novel-miRNA 的比率分别为 31.79%、30.85% 和 30.74%(图 1)。经过进一步的统计,总共获得 818 个 miRNA, 其中 novel-miRNA 有 241 个, 占 29.46%。如此多的 novel-miRNA, 表明水稻中依然有很多的 miRNA 有待发现。

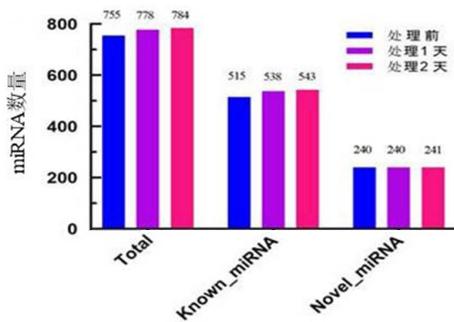
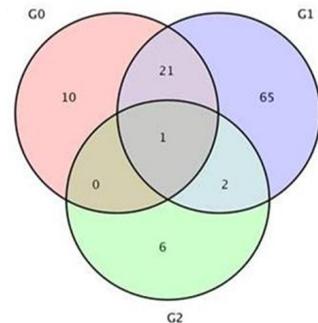


图 1 不同低温处理时间下 miRNA 表达数量

2.2 不同低温时间处理下 miRNA 的差异表达分析

为了筛选参与水稻低温胁迫的 miRNA, 利用 DESeq2_EBSeq 软件筛选 $P \leq 0.05$ 且 $|\text{fold change}| \geq$

2 条件下的 CK vs T1 (G0)、CK vs T2 (G1) 和 T1 vs T2 (G2) 差异表达 miRNA。并利用 G0、G1 和 G2 的差异表达 miRNA 绘制维恩图(图 2)。从图 2 可见, 同时且仅在 G0 和 G1 之间存在差异表达的 miRNA 有 21 个。这 21 个差异表达的 miRNA 在 G0、G1 中都有 16 个 miRNA 表达上调, 5 个 miRNA 表达下调, 且表达上调和下调的 miRNA 在 G0 和 G1 中都相同(图 3, 表 2)。这些结果表明, 这 21 个差异表达的 miRNA 有可能参与水稻的低温胁迫。



注: G0 为 CK vs T1, G1 为 CK vs T2, G2 为 T1 vs T2。

图 2 G0、G1 和 G2 三个差异表达 miRNA 群体间的维恩图

表 2 21 个低温胁迫响应 miRNA 基本信息

miRNA 编号	miRNA 序列	miRNA 碱基 数目/nt	相对表达量		
			CK	T1	T2
novel_miR_148	CACUGACAUGUGGGUCCCACCU	22	6.04	11.89	10.81
novel_miR_175	CACUGACAUGUGGGUCCCACCU	22	8.15	18.30	15.49
novel_miR_188	AUAGACCUCUGACUCGUACAUGCG	24	51.26	19.31	11.17
novel_miR_221	CACUGACAUGUGGGUCCCACCU	22	6.04	11.89	10.81
novel_miR_41	AACACCGGAUUCGAAUCUUUUG	22	274.07	88.81	67.75
novel_miR_5	GGUGCGGCACGGCCGUCGAGU	22	2.65	9.34	14.97
novel_miR_7	GGUGCGGCACGGCCGUCGAGU	22	2.65	9.34	14.97
novel_miR_70	UCCUGUCGGCGCAGCUG	18	36.35	85.98	74.78
osa-miR1430	UGGUGAGCCUCCUGGCUAAG	21	14.64	29.97	18.11
osa-miR166c-5p	GGAAUGUUGUCUGGUCCGAG	20	8.60	22.41	14.25
osa-miR166h-5p	GGAAUGUUGGCUGGCUCGAGG	21	18.42	60.83	46.80
osa-miR166m	UCGGACCAGGCUUCAUCCCU	21	1 382.72	780.04	472.98
osa-miR169i-5p.2	UGGUGAUAAGGGUGUAGCUCUG	22	292.08	97.11	65.72
osa-miR171i-5p	AGGUAUUGGGUGCCUCAUC	21	3.38	11.38	12.07
osa-miR1846a-5p	AGUGAGGAGGCCGGGGCCGCU	21	60.67	118.96	163.58
osa-miR1846b-5p	AGUGAGGAGGCCGGGGCCGCU	21	60.67	118.96	163.58
osa-miR1846c-5p	AGUGAGGAGGCCGGGGCCGCU	21	2.04	7.83	10.17
osa-miR1860-5p	AGAAAACCAGCUCCAGAUCU	21	3.74	12.69	11.49
osa-miR5815	AAUGUUAUGGACACUAGAUGACAU	24	13.79	5.39	2.16
osa-miR6253	GAGGAAAGUGGGCAGUUGGGUU	22	0.54	4.78	12.30
osa-miR7695-3p	ACGUGAUGUGCCACGUAGGCA	21	3.11	8.68	7.10

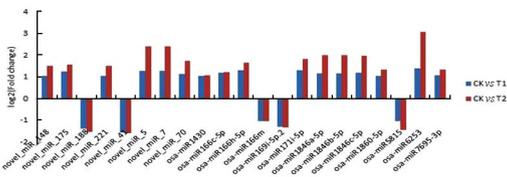


图 3 CK vs T1 和 CK vs T1 共有的 21 个低温胁迫响应 miRNA 的表达量

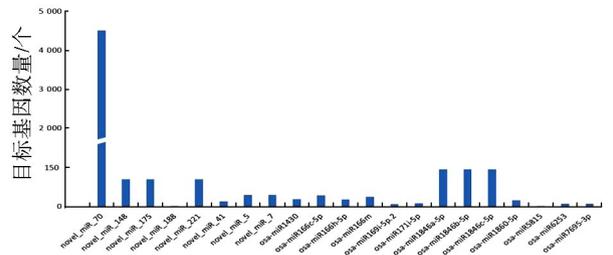


图 4 21 个差异表达 miRNA 的靶基因数量

2.3 差异表达 miRNA 的靶基因数量分析

为了进一步解析 miRNA 在水稻低温胁迫中的作用,对 21 个差异表达 miRNA 的靶基因进行分析,并统计了这 21 个 miRNA 的靶基因数目,其中拥有最多靶基因数目的 miRNA 是 novel_miR_70,含有 4 515 个靶基因(图 4)。

2.4 miRNA 靶基因 GO 注释和 KEGG 分析

在 T1,T2 和 CK 的小 RNA 文库中鉴定出的 21 个 miRNA 一共含有 5 568 个预测靶基因,其中未知 miRNA 的靶基因有 4 938 个,已知 miRNA 的靶基因有 630 个。为了探究 miRNA 在低温胁迫中的作用,对所有推测的靶基因进行 GO 富集分析(图 5)。

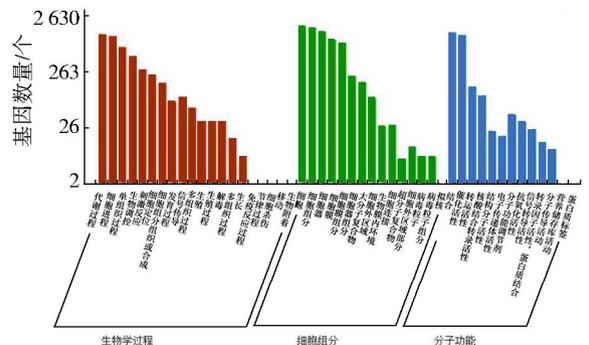


图 5 21 个低温胁迫响应 miRNA 靶基因 GO 富集图

sources, Conservation & Recycling, 2017, 126:99-106.

- [40] 窦亚芹,高昕,郑明轩.数字供应链金融与科技型企业融资模式创新[J].科技管理研究,2020,40(8):112-119.
- [41] 吴雅骊,易婷婷.零售企业协同知识、技术、管理创新与可持续供应链绩效的互动关系研究[J].商业经济研究,2021,(16):117-120.
- [42] 袁斌.跨境电子商务视角下国际物流供应链管理模式的构建[J].商业经济研究,2016(18):103-105.

(上接第 5 页)

- [10] ZHANG B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress [J]. Journal Experimental Botany, 2015, 66(7): 1749-1761.
- [11] YU X, WANG H, LU Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa* [J]. Journal Experimental Botany, 2012, 63(2): 1025-1038.
- [12] 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.
- [13] COVARRUBIAS A A, REYES J L. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs [J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33(4): 481-489.
- [14] BARRERA-FIGUEROA B E, GAO L, DIOP N N, et al. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11: 127.
- [15] YANG C, LI D, MAO D, et al. Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant, cell & environment, 2013, 36(12): 2207-2218.
- [16] WANG S T, SUN X L, HOSHINO Y, et al. MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. PLoS ONE, 2017, 9(3): e91357.
- [17] SUN M, SHEN Y, YANG J, et al. miR535 negatively regulates cold tolerance in rice [J]. Molecular Breeding, 2020, 40(1): 14.
- [18] ZHOU M, TANG W. MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2019, 294(2): 379-393.
- [19] SUN M, YANG J, CAI X, et al. The opposite roles of OsmiR408 in cold and drought stress responses in *Oryza sativa* [J]. Molecular Breeding, 2018, 38(10): 120.
- [20] SONG J B, GAO S, WANG Y, et al. miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in *Arabidopsis* [J]. Plant Gene, 2016, 5: 56-64.
- [21] DONG C H, PEI H X. Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Plant Biology, 2014, 57(4): 209-217.