

调控毛竹细胞壁形成关键 circRNAs 鉴定及功能分析

林小芳, 李雪平

(国际竹藤中心 北京 100102)

摘要: 毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 是我国种植面积最大的竹种, 其生长速度快、产量高、可再生能力强, 是优良的木材替代品。竹材的性能与细胞壁组成成分密切相关, 研究表明在毛竹生长过程中, 构成细胞壁成分的木质素、纤维素、多糖等含量也会发生相应变化, 导致竹材性能的改变。环状 RNA(circRNAs)是具有共价封闭结构的内源性非编码 RNA, 在植物中具有重要的功能。然而, 它们对于毛竹细胞壁形成的作用未知。因此分析毛竹细胞壁生物合成相关 circRNAs 对竹材的性能改良具有重要意义。本研究对四个生长时期——10 天、20 天、30 天、40 天的毛竹样品分别进行高通量转录组测序, 筛选出与细胞壁生物合成相关的两个关键 circRNAs, 构建过表达载体, 转化水稻并得到转基因水稻植株。结合生物信息分析和分子生物实验, 探究 circRNAs 在毛竹生长过程中对于细胞壁生物合成发挥的功能。鉴定得到 2973 个 circRNAs, 其中差异表达的 circRNAs 共 237 个, 结合 ORF 序列以及 IRES 区域分析 circRNAs 编码蛋白能力。基于基因本体论 (Gene Ontology, GO) 和京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 对差异表达的 circRNA 亲本基因进行功能预测, 同时构建了 circRNA-miRNA-mRNA 互作网络。最终筛选出 2 个与细胞壁形成相关的 circRNAs, 分别为: novel_circ_001532 和 novel_circ_002484, 它们的亲本基因分别是 PH02Gene34473 和 PH02Gene44766。CircRNA 验证实验结果证实了大多数 circRNA 确实抵抗外切酶降解, Sanger 测序进一步说明 novel_circ_001532 和 novel_circ_002484 是真实的 circRNA。RT-qPCR 分析结果表明: novel-circ-001532 的表达量在 10 天时最高, 且 3 个实验组 (20 天, 30 天, 40 天) 相比于 10 天均呈现显著差异; novel-circ-002484 的表达量在 3 个实验组基本一致, 相比于 10 天均呈现显著差异; 对目标 circRNA 的亲本基因进行亚细胞定位发现: PH02Gene34473 和 PH02Gene44766 均位于细胞核区域。毛竹在 4 个时期的细胞壁超微结构呈现不同层面的变化: 从初生壁沉积到次生壁开始形成、加厚至多层次生壁形成; 细胞角隅自溶现象随生长而加剧, 溶解的角隅形成颗粒状物质。间苯三酚染色法揭示随着毛竹幼苗的生长, 木质化程度越高, 且同一时期茎部木质化程度高于叶片部位, 这种差距随着生长时期不断加大。此外, 毛竹细胞壁不同种类细胞的木质化程度规律为: 纤维细胞最早开启木质素沉积且完全木质化周期最短。薄壁细胞木质化的启动晚于纤维细胞。测定 4 个生长时期的毛竹不同组织——茎、叶木质素含量, 结果显示两者木质素含量变化趋势一致。本研究为理解 circRNA 对毛竹细胞壁生物合成过程中发挥的作用提供了初步的见解, 并为竹子的良种繁育研究提供了新的见解。

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD2200504_4)

*作者 2 为通讯作者。