

触发phasiRNAs的miRNAs参与 湿地松胚性愈伤增殖过程的稳态维持

刘阳¹ 薛蕾¹ 郭文冰¹ 王哲¹ 曾明¹

(1. 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】为探究非酚类物质积累导致的胚性愈伤团褐变机制, 解析小分子 RNA 在其中发挥的调控作用。【方法】以遗传背景相同的抗/易褐变胚性无性系为研究对象, 将二者的胚性愈伤团于继代后第 0 天, 第 7 天和第 14 天取样, 进行小 RNA 测序、转录组测序及降解组测序, 然后基于多组学联合分析, 解析小 RNA 及其靶基因级联网络及可能的生物学功能。【结果】抗/易褐变胚性愈伤团小 RNA 序列的长度特征有明显差异, 长度为 24nt 的小 RNA 数量在易褐变胚性愈伤中 0d 最高, 但抗褐变材料中 14d 最高, 且占比为易褐变材料的 2 倍。从中共鉴定到 291 个 miRNA, 包括 37 个火炬松已知的 miRNA、67 个物种间高度保守的 miRNA、92 个非保守的 miRNA 以及 95 个全新的 miRNA。其中, 长度为 21nt 的 miRNA 有 126 个(45.16%), 长度为 22nt 的 miRNA 有 77 个(27.60%)。这些 miRNA 中仅有 23 个为高表达 miRNA, 包括保守的 miR166、miR482、miR319、miR390 等, 也有裸子植物特有的 miRNA 以及新鉴定的 miRNA; 而另外 149 个 miRNA 为中等表达 miRNA, 104 个为低表达 miRNA。与易褐变的胚性愈伤相比, 各时间节点上抗褐变材料中表达上调的 miRNA 较多; 而随着培养时间的延长, 抗褐变胚性愈伤中较多 miRNA 表达下调, 而易褐变材料在 0-7d 时仍有较多 miRNA 上调。进一步预测差异 miRNA 的靶基因并进功能富集, 防御反应 (Defense response) 和信号转导 (Signal transduction) 等生物学过程被显著富集。通过降解组分析被靶向切割的位点形成的峰值位置, 验证所预测的靶基因是否真实被 miRNA 切割, 发现仅有三成所预测的靶基被降解组验证。通过检查 T-plot 图并人工矫正, 从中最终获得 42 个可靠的经降解组确认的靶基因, 由 33 个 miRNA 靶向切割, 其中还包括 5 个全新的 miRNA。这些经验证的靶基因中有 32 个的注释为 unknown, 通过借助湿地松体胚过程的三代转录组数据, 对这些基因的注释进行矫正, 发现这些靶基因中, 3 个为 miR166 的靶基因, 编码 HD-ZIP 转录因子, 2 个为 miR160 的靶基因, 编码 ARF 转录因子, 1 个为 miR397 的靶基因, 编码漆酶 (Laccase), 其余均靶向各类抗性 R 基因 (Resistance genes)。由于 miRNA 靶向这几类 R 基因通常会形成 phasiRNA, 进一步鉴定了 phasiRNA 的产生位点, 发现了 162 个 PHAS 位点, 其中有 42 个由 miRNA 触发, 且有一条完整的级联反应链经小 RNA 组和降解组证实: miR3701 靶向 PHAS 位点 (Scaffold199784_1 47680:48113) 触发 phasiRNA 产生, 而其中一个 phasiRNA (UCGUAACUCCA UCUUAAUCGU) 继续靶向下一个靶基因, 将其表达量控制在很低的水平。【结论】抗褐变与易褐变胚性愈伤中, 差异 miRNA 的靶基因大多为抗性 R 基因, 大量 phasiRNA 被 miRNA 触发并形成级联反应, 将相应靶基因的表达精细控制在较低的水平, 从而维持了高速增殖的胚性愈伤团的稳态, 降低了褐变的发生。

关键词: 湿地松; 胚性愈伤团; 褐变; miRNA; phasiRNA

中图分类号: S791.246

文献标识码: A