

张紫阳, 刘艳, 魏瑞研, 等. 基于高通量测序的低温胁迫下赤桉 miRNAs 的挖掘与分析 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 64-74.
ZHANG Ziyang, LIU Yan, WEI Ruiyan, et al. Mining and analysis of miRNAs from *Eucalyptus camaldulensis* under low temperature stress based on high-throughput sequencing[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 64-74.

基于高通量测序的低温胁迫下赤桉 miRNAs 的挖掘与分析

张紫阳, 刘 艳, 魏瑞研, 林元震

(华南农业大学 林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】预测、挖掘和分析涉及赤桉 *Eucalyptus camaldulensis* 低温胁迫应答的 miRNA, 为研究其调控赤桉低温胁迫应答的分子网络奠定基础。【方法】采用高通量测序对低温处理组和对照 (CK) 组的赤桉组培苗茎尖进行小 RNA 测序。以 miRBase21.0、Rfam14.1 和巨桉 *E. grandis* 基因组为参考数据库, 利用 Bowtie、miREAP 和 miRDeep2 等软件进行 miRNA 预测, 使用 RNAfold 对预测到的 miRNA 前体进行二级结构的折叠; 采用 psRNATarget 预测靶基因, 通过 DESeq 包分析差异表达的 miRNA, 并对它们进行 GO 注释和 KEGG 富集分析。【结果】在赤桉中, 共预测到隶属于 54 个家族的 392 个已知 miRNA 和 97 个新 miRNA; 其中, CK 组共预测到 282 个已知 miRNA, 65 个新 miRNA; 低温处理组共预测到 329 个已知 miRNA, 51 个新 miRNA。挖掘到 80 个在低温处理下显著差异表达的 miRNA, 包括 55 个上调和 25 个下调。GO 基因功能注释和 KEGG 富集分析的结果表明, 这些差异表达 miRNA 可能通过参与代谢通路、次生代谢物的生物合成、细胞膜的改变、信号转导和生物调节等响应低温胁迫。此外, 还挖掘到 25 个可能与 ICE1-CBFs-COR 通路有关的 miRNA。【结论】借助高通量测序和生物信息学软件初步得到了低温胁迫下差异表达的赤桉 miRNA, 为进一步分析这些 miRNA 在赤桉低温胁迫中的分子功能提供一些参考。

关键词: 赤桉; miRNA; 低温胁迫; 高通量测序

中图分类号: S718.46; Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)03-0064-11

Mining and analysis of miRNAs from *Eucalyptus camaldulensis* under low temperature stress based on high-throughput sequencing

ZHANG Ziyang, LIU Yan, WEI Ruiyan, LIN Yuanzhen

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To predict, mine and analyze the miRNAs involved in low temperature stress response of *Eucalyptus camaldulensis*, and lay a foundation for further study of the molecular network of regulating low temperature stress response. 【Method】Small RNAs were sequenced by high-throughput sequencing using the shoot tips of the tissue cultured seedlings of *E. camaldulensis* from the low temperature treatment group and the control group (CK). The miRBase21.0, Rfam14.1 and *E. grandis* genome were taken as reference databases. Bowtie, miREAP as well as miRDeep2 software were used for miRNA prediction. RNAfold was used to fold the

收稿日期: 2020-11-11 网络首发时间: 2021-03-22 10:28:15

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210319.1556.002.html>

作者简介: 张紫阳 (1995—), 男, 硕士研究生, E-mail: xizzy@live.cn; 通信作者: 林元震 (1979—), 男, 副教授, 博士, E-mail: yzhlin@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B020215002); 国家自然科学基金 (31470673)

secondary structure of the predicted miRNA precursors. psRNATarget was used to predict target genes. The miRNAs with differential expression were analyzed through DEGSeq package, and GO annotation and KEGG enrichment analysis were further performed. 【Result】 A total of 392 known miRNAs and 97 novel miRNAs belonging to 54 families were predicted in *E. camaldulensis*. The 282 known miRNAs and 65 novel miRNAs were predicted in CK, while 329 known miRNAs and 51 novel miRNAs were predicted in the low temperature treatment group. At the same time, 80 significantly differentially expressed miRNAs in low temperature treatment group were mined, including 55 up-regulated and 25 down-regulated. The results of GO annotation and KEGG enrichment analysis indicated that these differentially expressed miRNAs might respond to low temperature stress by participating in metabolic pathways, biosynthesis of secondary metabolites, cell membrane changes, signal transduction, and biological regulation. In addition, we found 25 miRNAs that might be associated with the ICE1-CBFs-COR pathway. 【Conclusion】 The differentially expressed miRNAs are initially obtained by high-throughput sequencing and bioinformatics software under low temperature stress, which can provide some references for further analysis of the molecular functions of these miRNAs in *E. camaldulensis* under low temperature stress.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis*; miRNA; low temperature stress; high-throughput sequencing

赤桉 *Eucalyptus camaldulensis* 是桃金娘科 Myrtaceae 桉属 *Eucalyptus* 比较广泛栽培的树种, 原产于澳大利亚, 与其他桉树相比, 赤桉具有高抗寒性, 是研究桉树抗寒分子机理的理想材料^[1]。

miRNA 是由 *microRNA* 基因所编码、II 型 RNA 聚合酶 (Pol II) 和 DCL1 酶 (Dicer-like 1) 等加工形成的长度约 18~24 nt 的单链非编码 RNA^[2]。研究证实, miRNA 通过对靶基因的剪切或抑制来实现转录后水平上的负调控, 在植物的生长发育、形态建成和信号转导以及逆境胁迫响应中都发挥着重要的调控作用^[3-5]。

低温是一种常见的环境因子, 它限制植物只能在特定的地理位置和季节生长。植物为适应低温胁迫, 在生理生化和分子水平上形成了一系列的抵御机制, 包括瞬时 Ca^{2+} 和脱落酸 (ABA) 含量的提高、植物体液组成的改变、抗氧化物含量的增加, 以及一些渗透调节物质的集聚^[6]。最早在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中发现低温胁迫下 miRNA 的表达丰度会发生变化^[7], 之后许多研究报道了木本植物低温胁迫下差异表达的 miRNA^[4,8]。华南农业大学桉树育种课题组前期对赤桉耐寒关键性转录因子 ICE1 (Inducer of CBF expression 1)^[9]、SIZ1 (SAP and Miz) 苏素化^[10] 和 HOS1 (High expression of osmotically responsive gene 1) 泛素化^[11] 通路进行了一些研究, 但在赤桉 ICE1 通路及其上下游中是否有 miRNA 参与调节, 仍然未知。本研究拟通过高通量测序和生物信息学软件相结合的方式, 挖掘、分析涉及低温胁迫应答的赤桉 miRNA, 以进一步弄清赤桉低温胁迫应答的完整分子调控网络, 并为后

续的桉树抗寒分子育种提供一些理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

赤桉无性系 CV103 无菌组培苗取自广东省森林植物种质创新与利用重点实验室。在 MS 培养基 (pH=5.8) 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, 并接种赤桉无菌苗, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 16 h 光照、8 h 黑暗光周期培养 3~4 个月。低温处理组于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下处理 24 h, 对照组 (CK) 不进行处理。分别选取长势健壮无菌苗的茎尖组织, 液氮速冻后磨碎, 用 Trizol (上海生工生物工程技术服务有限公司) 提取总 RNA。

1.2 Small RNA 文库构建与测序

用 Qubit 2.0 (Thermo, 美国) 对总 RNA 进行定量, 使用 T4 RNA 连接酶 (NEB, 美国) 将 RNA 3'端和 5'端与接头连接, 随后用 M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB, 美国) 合成 cDNA 单链, 经 PCR 扩增后通过 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳回收 140~150 bp 左右的 PCR 产物条带, 通过质检后得到满足 Illumina 平台测序的文库, 并委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行高通量测序。

1.3 测序数据处理

测序下机的原始序列 (Raw reads) 经过去接头, 去低质量、冗余序列等处理后得到纯净序列 (Clean reads), 使用 Bowtie (参数为 -v 1) 将纯净序列匹配到巨桉 *E. grandis* 基因组上, 得到的序列再与 Rfam14.1 数据库对比, 过滤其他非编码 RNA。

1.4 miRNA 的预测

以 miRBase21.0 库中植物和巨桉^[12] 的 miRNA 序列为参考源,使用 blastn 软件预测已知 miRNA。具体参数为: -task blastn-short-word_size 16-evalue 0.01。将错配数≤1、 $e<0.01$ 的序列作为潜在 miRNA。同时,将这些潜在的 miRNA 用 Bowtie(参数为 -v 2) 匹配回巨桉基因组后,通过 miREAP 和 RNAfold 软件预测所有已知 miRNA 及其二级结构。未匹配上的序列,继续使用 miRDeep2(v2.0.0.8)^[13] 软件预测新 miRNA,采用默认参数。

对不同长度 miRNA 的首位碱基进行统计并绘制直方图,分析赤桉 miRNA 碱基的偏好性。本文除了 miRNA 二级结构采用 RNAfold 软件生成,其他所有图形均使用 R 语言绘制^[14]。

1.5 差异表达 miRNA 的挖掘与分析

低温处理下赤桉差异表达的 miRNA 采用 Bioconductor 中的 DESeq^[15] 包分析。首先将 2 组数据使用 TPM 进行归一化处理,归一化表达量=(Readcount×1 000 000)/libsize, 其中: Readcount 为 miRNA 序列数目, libsize 为样品所有 miRNA 序列数目之和。设置 DESeq 的算法为 MARS, 进行差异分析。定义表达量变化 2 倍以上且 $P<0.001$ 的为显著差异表达 miRNA。

1.6 miRNA 靶基因预测与富集分析

使用 psRNA Target^[16] 软件对 miRNA 进行靶基因预测,采用默认参数。同时对差异表达 miRNA 的靶基因分别进行 Gene ontology^[17] (<http://www.geneontology.org/>) 和 KEGG^[18] (<http://www.genome.jp/kegg/>) 富集分析。GO 注释使用在线网站 agriGO v2.0^[19] (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php>), 并定义 $P<0.05$ 为显著差异的类别。KEGG 使用 KOBAS3.0^[20] 软件,该软件以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验进行分析:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}, \tag{1}$$

式中, p 为 KEGG 通路富集概率, i 为求和中的特定项, N 为所有基因中具有通路注释的基因数目, n 为 N 中候选靶基因的数目, M 为所有基因中注释为某特定通路的基因数目, m 为注释为某特定通路的候选靶基因数目。同时,以拟南芥的低温胁迫响应网络和华南农业大学桉树育种课题组前期研究为参考,进一步挖掘涉及 ICE1-CBFs-COR 通路的 miRNA。

2 结果与分析

2.1 测序数据分析

对照组和低温处理组的小 RNA 高通量测序分别得到 29 725 524 和 31 104 120 条原始序列,过滤掉低质量、两端接头和重复序列后,最后分别得到 15 813 414 和 14 456 077 条纯净序列。质控数据显示,低温处理组的 Q30 为 96.47%,对照组的 Q30 为 96.46%,结果可靠性高。此外,纯净序列的长度统计结果(图 1)显示:2 组小 RNA 长度的分布特征基本一致,以 21 nt 分布最多,其次是 20 和 24 nt。

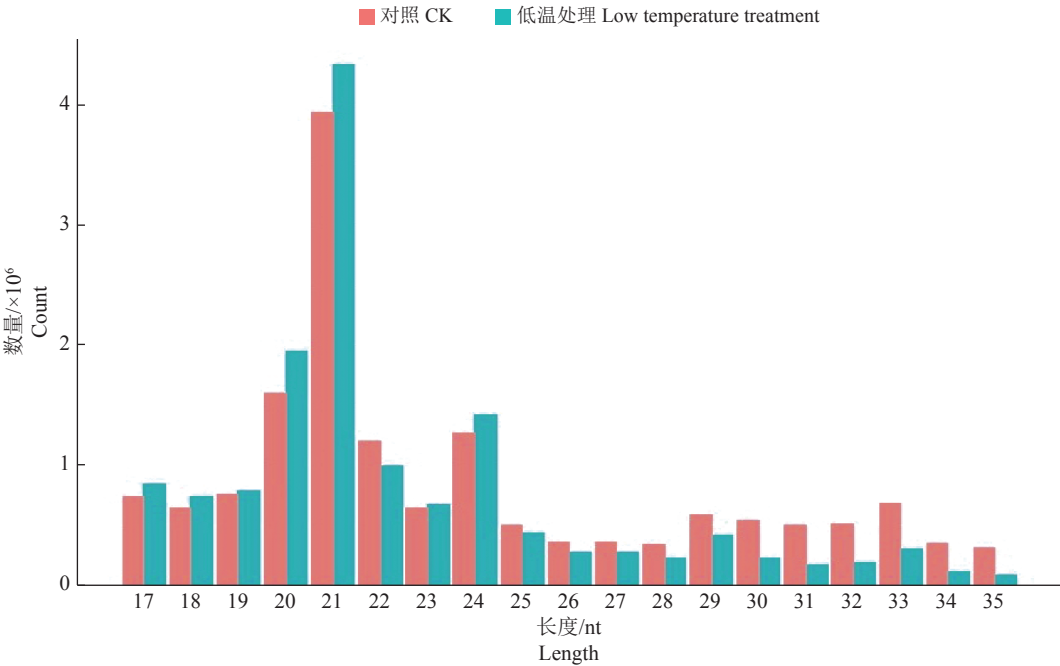


图 1 赤桉小 RNA 纯净序列的长度分布图

Fig. 1 Length distribution of clean reads of small RNA in *Eucalyptus camaldulensis*

2.2 赤桉已知 miRNA 和新 miRNA 的预测

以 RFam 数据库对纯净序列进行注释, 结果如表 1 所示, 除了其他类别外, 核糖体 RNA(rRNA) 占比最高, 在对照和低温处理组中分别占比 30.27% 和 26.08%, 而核仁小 RNA (snoRNA) 占比最少, 分别占比 0.21% 和 0.17%。过滤掉 rRNA、snRNA、snoRNA 和 tRNA 序列后, 以巨桉和 miRBase21 中所有植物的成熟 miRNA 为参考组, 进行 miRNA 预

测, 结果如图 2 所示: 2 组数据一共预测到 392 个已知 miRNAs(隶属于 54 个家族), 其中对照组 282 个, 低温处理组 329 个, 它们共同的有 219 个; 预测到 97 个新 miRNA, 其中对照组 65 个, 低温处理组 51 个, 它们共同的有 19 个。在预测到的所有 miRNA 中, 长度均以 21 nt 为主, 其次, 已知 miRNA 为 20 和 22 nt, 新 miRNA 为 24 nt(图 3)。图 4 展示了部分预测 miRNA 前体的二级结构。

表 1 赤桉小 RNA 分类统计
Table 1 Classification statistics of small RNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

种类 Type	对照 CK		低温处理 Low temperature treatment	
	数量 Count	占比/% Percentage	数量 Count	占比/% Percentage
核糖体RNA rRNA	4 787 452	30.27	3 769 781	26.08
核内小RNA snRNA	55 640	0.35	32 977	0.23
核仁小RNA snoRNA	33 402	0.21	24 413	0.17
转运RNA tRNA	828 159	5.24	368 918	2.55
其他 Other	10 108 761	63.93	10 259 988	70.97
总计 Total	15 813 414	100.00	14 456 077	100.00

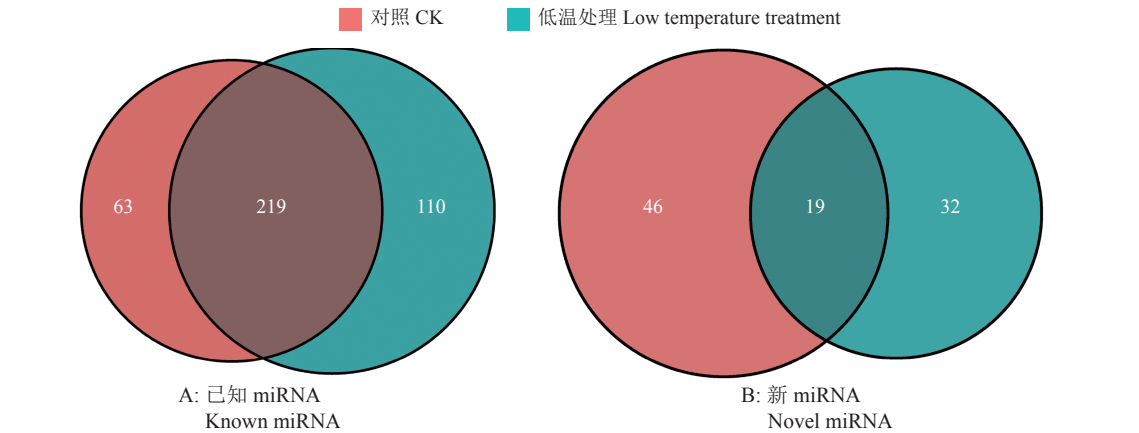


图 2 赤桉 miRNA 维恩图
Fig. 2 Venn diagram of miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

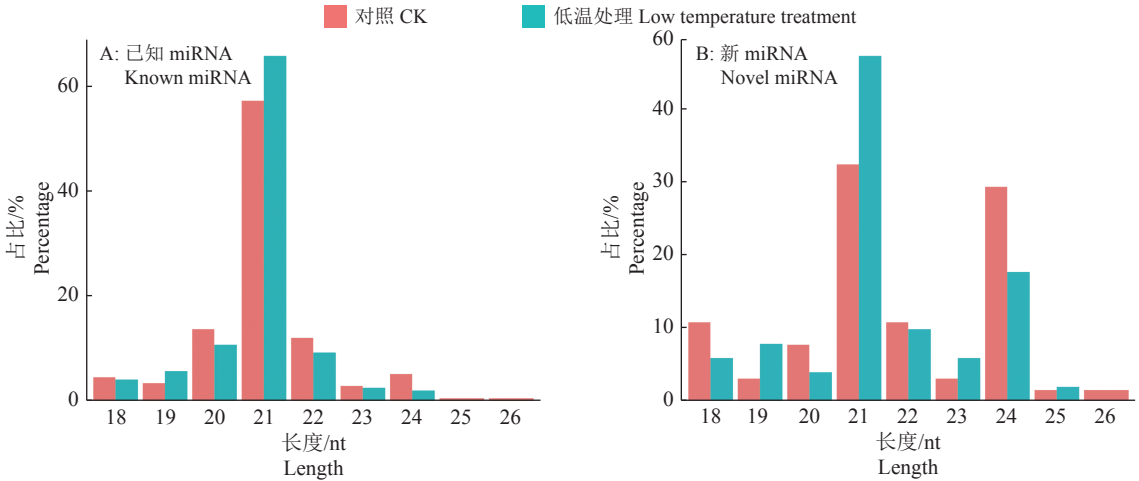


图 3 赤桉预测 miRNA 长度分布
Fig. 3 The length distribution of the predicted miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

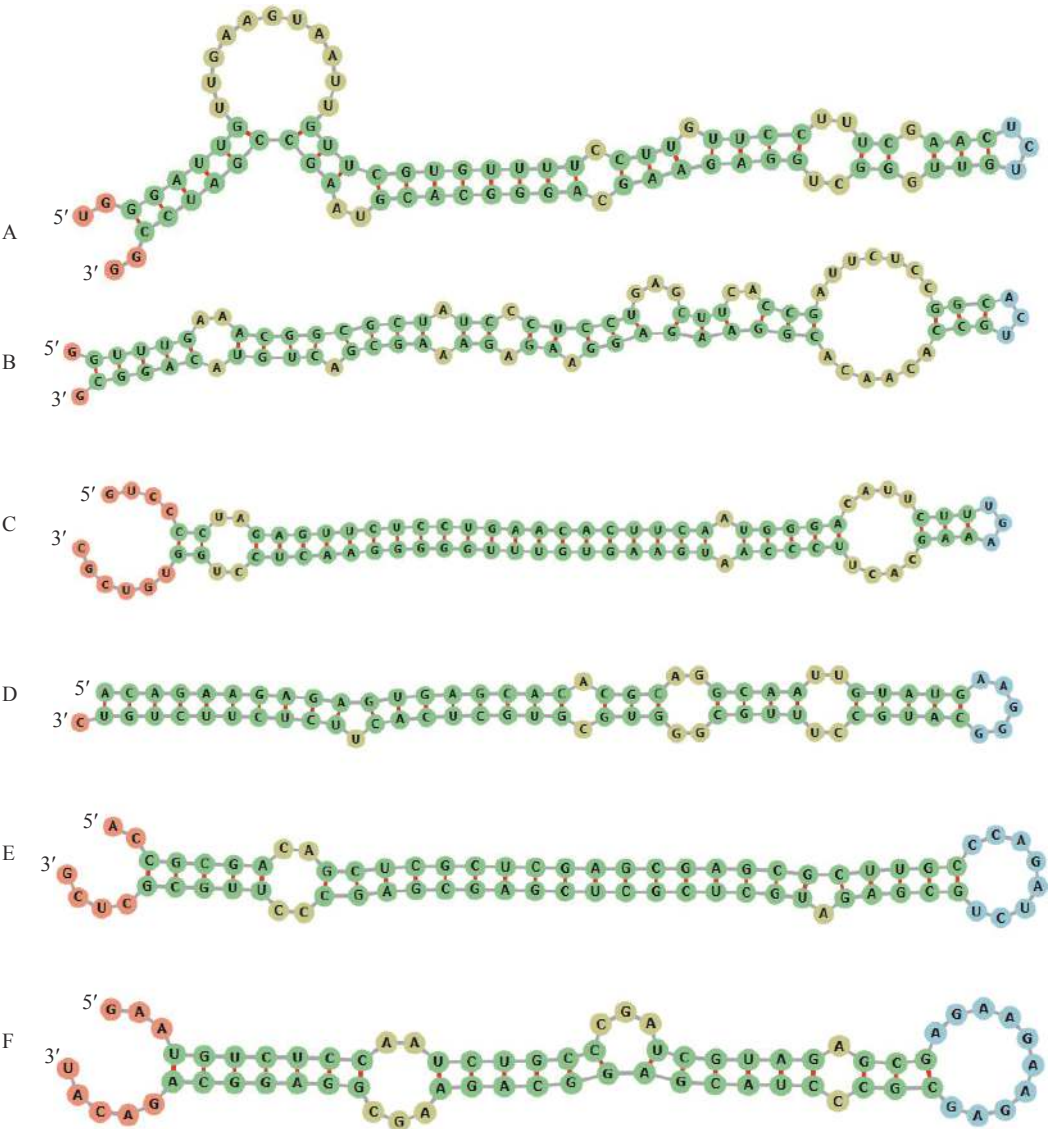


图 4 赤桉部分预测 miRNA 前体二级结构

Fig. 4 The secondary structure of some predicted miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

miRNA 是由 DCL1 酶剪切得到的, DCL1 酶在剪切 pre-miRNA 时, 对其 5'端第 1 个碱基具有强烈的偏好性, 尤其体现在对尿嘧啶 (U) 的偏好上。miRNA 首位碱基偏好性结果表明, 对照和低温处理组均呈现出相似规律, 具体为: 长度为 18 nt 的 miRNA 其主要为腺嘌呤 (A), 19~22 nt 的 miRNA 其主要为尿嘧啶 (U), 而 23~26 nt 的 miRNA 其以腺嘌呤 (A) 或鸟嘌呤 (G) 为主 (图 5)。

2.3 差异表达 miRNA 分析

以 TPM 标准化后的序列数为源数据, 使用 DESeq 包分析对照组和低温处理组 2 个样品间差异表达的 miRNA。共筛选出 80 个显著差异表达

的 miRNA(图 6), 包括 55 个显著上调 (含 10 个新 miRNA) 和 25 个显著下调的 miRNA(含 16 个新 miRNA)。上调的 miRNA 归属于 miR395、miR167、miR399、miR8282、miR477、miR156、miR171 和 miR482 (eca-miR482a-3p, eca-miR482d-5p) 等 8 个家族, 而下调的 miRNA 归属于 miR862、miR482(eca-miR482b-5p)、miR6300、miR397 和 miR10506 等 5 个家族。

2.4 靶基因预测和基因富集分析

默认参数下, psRNATarget 软件共预测到 17 614 个靶基因, 其中低温胁迫下差异表达 miRNA 的靶基因有 5 983 个。这些差异表达 miRNA 的靶基因

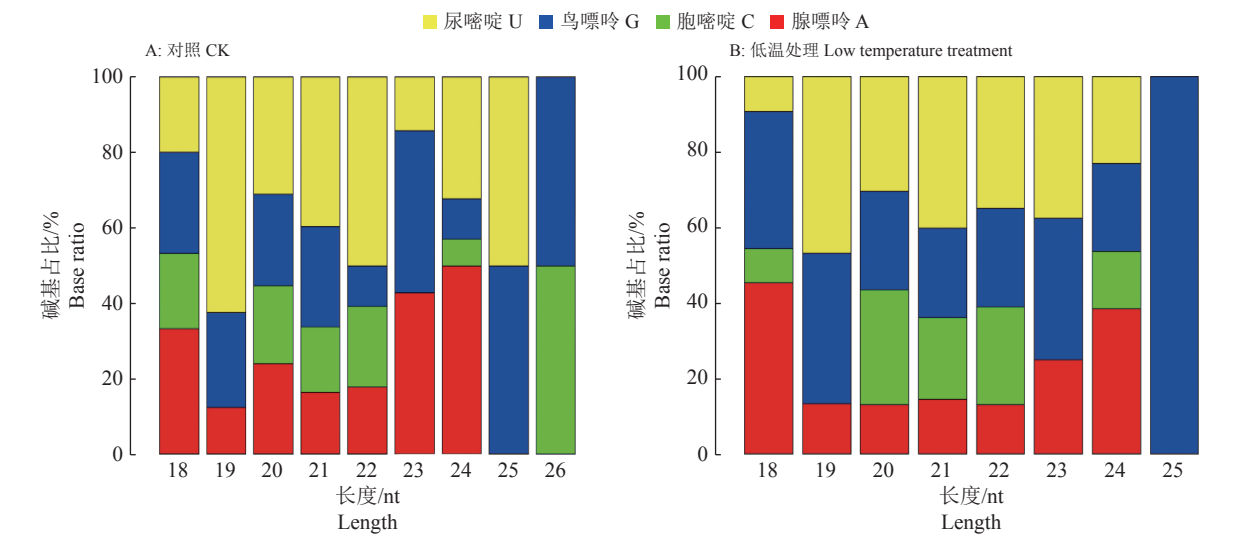


图 5 赤桉不同长度 miRNA 首位碱基偏好性

Fig. 5 Bias of the first base of different length miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

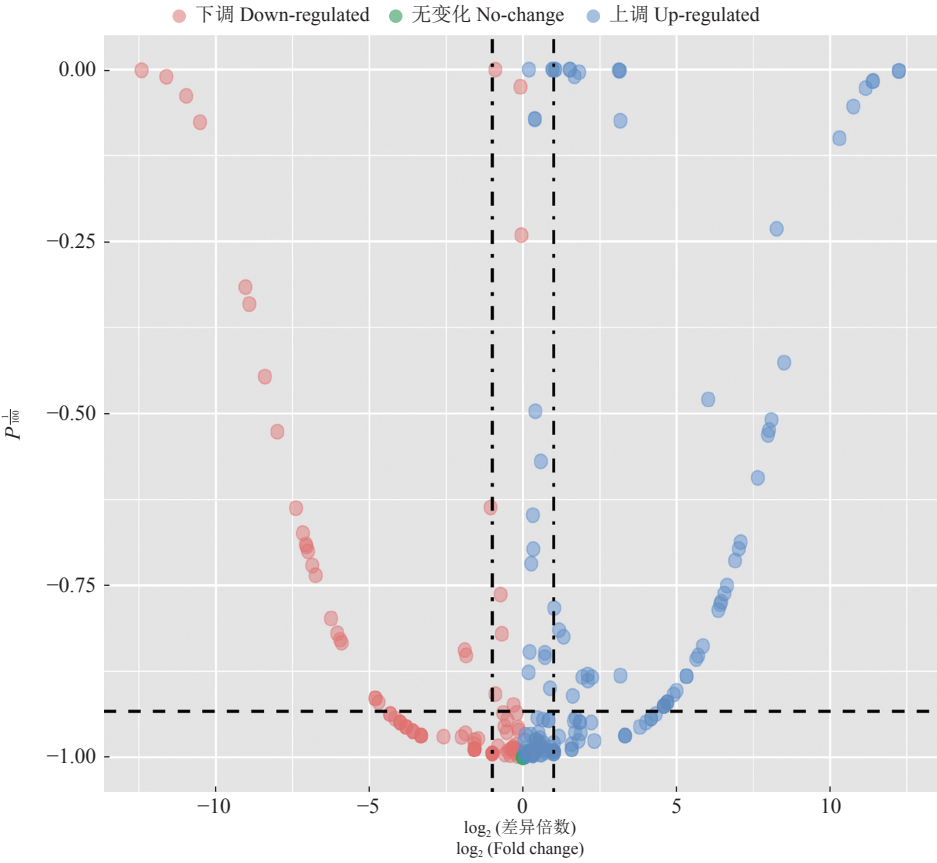


图 6 赤桉差异表达 miRNA 火山图

Fig. 6 Volcanic map of differentially expressed miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

GO 注释结果 (图 7) 显示, 定位到 87 个功能群中, 包括分子功能 (Molecular function, MF)49 个、生物学过程 (Biological process, BP)31 个和细胞组成 (Cell component)7 个。这些靶基因中最多的一类是分子功能, 主要集中在结合作用; 在生物学过程

中, 主要集中在单一生物过程、生物调节和信号转导; 在细胞成分中, 靶基因主要与细胞膜有关。KEGG 富集分析结果表明, 这些靶基因参与的通路有 23 条, 其中代谢通路 (Metabolic pathway) 和次生代谢物的生物合成 (Biosynthesis of secondary

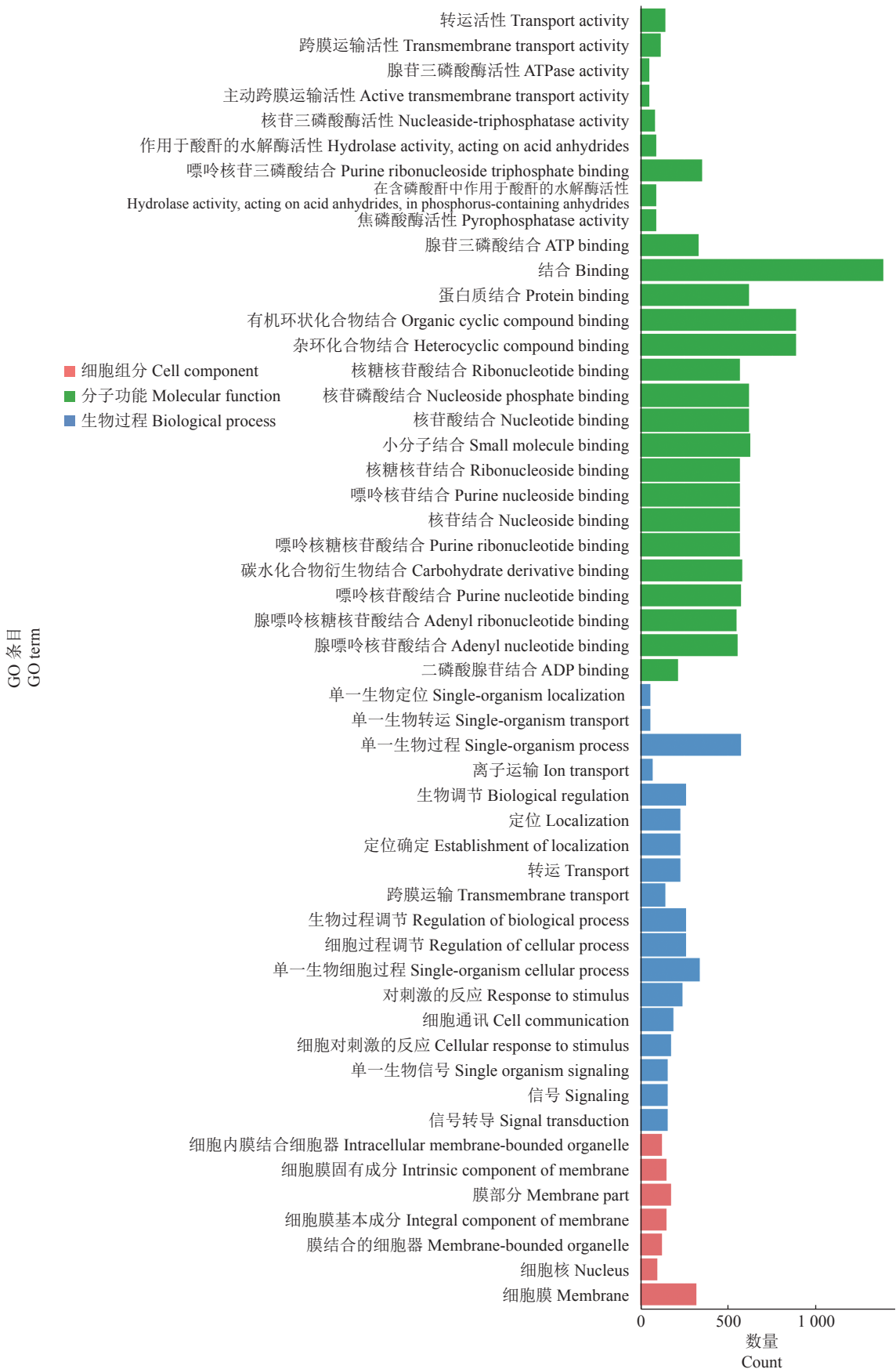


图 7 赤桉差异表达 miRNA 靶基因的 GO 注释

Fig. 7 GO annotation of the target genes of differentially expressed miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

metabolite) 最多, 分别占到了 36.7% 和 17.8% (图 8)。

2.5 赤桉 ICE1-CBFs-COR 通路相关 miRNA 的筛选

ICE1-CBFs-COR 通路是植物低温胁迫应答的

重要信号转导途径^[21], 本试验进一步筛选到 25 个与该通路相关的 miRNA(表 2)。这些靶基因主要编码蛋白激酶、E3 泛素化连接酶和转录因子, 具体包含: *ICE1*, 直接调控 *ICE1* 的 *MPK6*(Mitogen-activated protein kinase 6)、*OST1*(Open stomata 1)、*HOS1*、

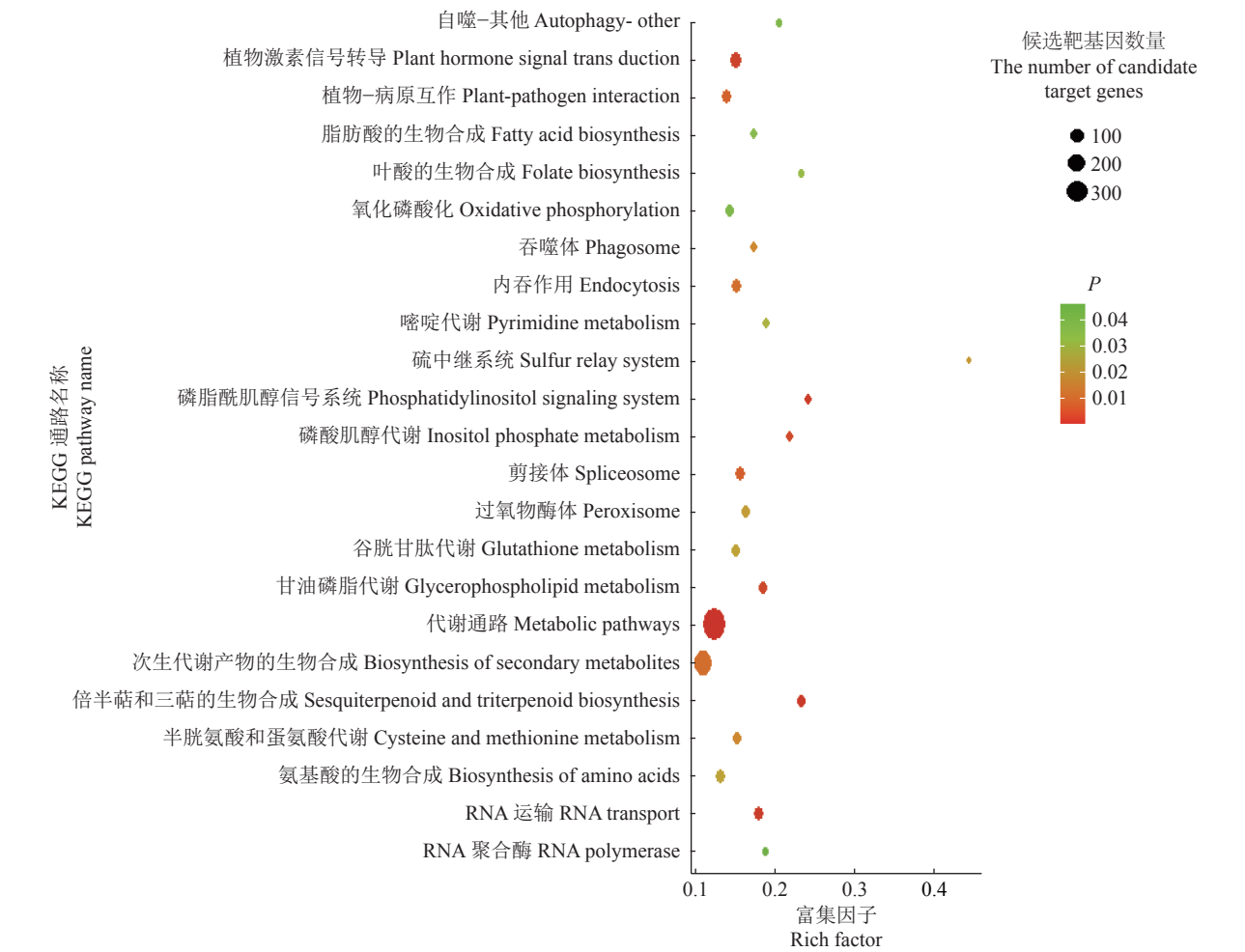


图 8 赤桉差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 富集分析

Fig. 8 KEGG pathway analysis of the target genes of differentially expressed miRNAs in *Eucalyptus camaldulensis*

表 2 赤桉 ICE1-CBFs-COR 通路相关 miRNA

Table 2 The miRNAs associated with ICE1-CBFs-COR pathway in *Eucalyptus camaldulensis*

miRNA ¹⁾	长度/nt Length	序列(5'→3') Sequence	靶基因 Target gene	基因ID Gene ID	蛋白质特征 Protein characteristic
eca-miR-n33	21	ACGGAUUGUUCGAGCCGACU	<i>ICE1</i>	Eucgr.G01938	转录因子 Transcription factor
eca-miR171g-3p	19	UGAGCCGGACCAUAUCAC	<i>MPK6</i>	Eucgr.L00026	蛋白激酶 Protein kinase
eca-miR171j-3p	22	GAUGAGCCGGACCAUAUCACG	<i>MPK6</i>	Eucgr.L00026	蛋白激酶 Protein kinase
eca-miR5780b-5p	23	UCCAGUCUCUGAUCAAUUUUGAC	<i>OST1</i>	Eucgr.E00345	蛋白激酶 Protein kinase
eca-miR390b-5p	21	GGCGCUAUCCCUCUGAGCUU	<i>OST1</i>	Eucgr.I00977	蛋白激酶 Protein kinase
eca-miR-n51↓	21	GAAUGUCUCCAAUCUGCCCGA	<i>OST1</i>	Eucgr.H04745	蛋白激酶 Protein kinase
eca-miR-n60	20	AGCUCAUCCAUCUGUAAGAG	<i>OST1</i>	Eucgr.D02135	蛋白激酶 Protein kinase
			<i>BZR1</i>	Eucgr.H01239	转录因子 Transcription factor
eca-miR156m-3p	20	UGCUCUCUCUCUUCUGUCAA	<i>BZR1</i>	Eucgr.F01541	转录因子 Transcription factor
eca-miR156o-3p	20	UGCUCUCUAUCUUCUGUCAA	<i>SOCI</i>	Eucgr.A02846	转录因子 Transcription factor
eca-miR156j-5p	21	UUGACAGAAGAGAGAGACAC	<i>SOCI</i>	Eucgr.D02427	转录因子 Transcription factor

续表 2 Continued table 2

miRNA ¹⁾	长度/nt Length	序列(5'→3') Sequence	靶基因 Target gene	基因ID Gene ID	蛋白质特征 Protein characteristic
eca-miR159k-3p	19	UUUGGAUUGAAUGGAGUCU	<i>SOC1</i>	Eucgr.K00208	转录因子 Transcription factor
eca-miR94a-3p	21	UCCCGGGAACAGAAUCAUUAC	<i>EIN3</i>	Eucgr.J00631	转录因子 Transcription factor
eca-miR845c-3p	20	CCUACAAUUGGUAUCAGAGC	<i>PIF3</i>	Eucgr.B01825	转录因子 Transcription factor
eca-miR-n38	21	AGGUGAAUUCUUAUAGAUGCA	<i>PIF3</i>	Eucgr.B01825	转录因子 Transcription factor
eca-miR482f-3p	21	UCUUUCCUAUUCUCCAUUCC	<i>SIZ1</i>	Eucgr.B02470	E3 泛素化连接酶 E3 SUMO ligase
eca-miR23a-5p	25	UGAGAGUGAGUGUAGAGUAGGGAAU	<i>HOS1</i>	Eucgr.E00402	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR-n2	21	GCUCCCCAAACUGACUACCAA	<i>HOS1</i>	Eucgr.E00402	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR-n41↓	22	UCGGAAGUCUUUGAGGGAGAGA	<i>EBF1</i>	Eucgr.C01723	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR862a-5p↓	21	AGUUUCCUUGAAGACAUCCAA	<i>EBF1</i>	Eucgr.C01524	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR845a-5p	20	AGCUCUGAUACCAAUUGUUG	<i>EBF1</i>	Eucgr.C02778	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR396a-3p	21	AAGCUCAAGAAAGCUGUGGGA	<i>EBF1</i>	Eucgr.C02778	E3 泛素化连接酶 E3 ubiquitin ligase
eca-miR7782a-5p	19	AGUGGUACAGAGCAGGUU	<i>BTF3</i>	Eucgr.K02308	NAC 蛋白 β 亚基 β-subunit of NAC protein)
eca-miR7782b-5p	23	AGUGGUACAGAGCAGGUCGUCG	<i>BTF3</i>	Eucgr.K02308	NAC 蛋白 β 亚基 β-subunit of NAC protein)
eca-miR827b-5p	22	UUUUGUUGAUGGCCAUCUAAUC	<i>CAMTA3</i>	Eucgr.H04783	转录激活子 Transcription activator
eca-miR164b-3p	20	UGGAGAAGCAGGGCACGUAA	<i>PhyB</i>	Eucgr.A00380	光感受器 Photoreceptor

1) “↓”表示在4℃低温处理24 h后显著下调
1) “↓” shows significant down-regulation after 4℃ low temperature treatment for 24 h

SIZ1, 与调控 *ICE1* 下游的 *CBF1*~*CBF3* 有关的 *BTF3*(Basic transcription factor 3)、*CAMTA3* (Calmodulin-binding transcription activator 3)、*BZR1*(Brassinazole-resistant 1)、*EIN3*(Ethylene insensitive 3)、*PIF3*(Phytochrome-interacting factor 3) 和 *SOC1*(Suppressor of constans overexpression 1) 等。其中, 仅 eca-miR-n60 有 2 个靶基因, 其余均有 1 个靶基因; 多个 miRNA 靶向同一个基因, 比如 eca-miR5780b-5p、eca-miR390b-5p、eca-miR-n51 和 eca-miR-n60 均靶向 *OST1*。这些 miRNA 长度主要为 20~21 nt, 包括 8 个保守型 miRNA(miR156、miR159、miR164、miR171 和 miR482 等家族)、10 个非保守型 miRNA 以及 7 个新 miRNA。此外, 有 3 个 miRNA(eca-miR-n51, eca-miR-n41 和 eca-miR862a-5p) 经过 4℃ 低温处理 24 h 后显著差异表达, 其中, eca-miR-n51 靶向 *OST1*, 而 eca-miR-n41 和 eca-miR862a-5p 均靶向 *EBF1*, 其余的 miRNA 则差异不显著。

3 讨论与结论

本试验通过高通量测序共预测到隶属于 54 个家族的 392 个已知 miRNA 和 97 个新 miRNA, 并通过软件预测到 17 614 个靶基因。与对照组相比, 低温处理组在 4℃ 处理 24 h 后, 预测到 80 个显著

差异表达的 miRNA, 包括 55 个上调 miRNA 和 25 个下调 miRNA。GO 基因功能注释表明, 低温胁迫下 miRNA 的靶基因主要与结合作用、单一生物过程、生物调节和信号转导以及细胞膜有关; KEGG 富集分析表明, 差异表达 miRNA 靶基因可能在代谢通路和次生代谢物的生物合成中起关键作用。同时, 本试验还分析了可能参与到赤霉素 *ICE1*-CBFs-COR 通路有关的 miRNA。

在 miRNA 预测过程中, 发现 Lin 等^[12] 的巨桉成熟 miRNA 序列存在一些序列无法匹配到巨桉基因组的现象, 因此我们将 Lin 等^[12] 的 miRNA 序列与其他植物的 miRNA 整合后, 作为 miRNA 参考组, 再与测序下机后的纯净序列匹配, 得到潜在的已知 miRNA。随后, 将这些潜在已知 miRNA 匹配回巨桉基因组, 再使用 miREAP 和 RNAFold 软件寻找前体序列。但是, 由于赤霉素和巨桉属于近缘种, 基于巨桉基因组预测的 miRNA 有可能存在假阳性, 后续仍需试验进一步验证。

在植物中, 行使重要功能的 miRNA, 往往是保守的。本试验中, miR156、miR167、miR395 和 miR399 家族的多个成员在低温处理后均显著差异表达。Zhou 等^[22] 指出, miR156 家族广泛响应植物低温胁迫, 比如低温胁迫会诱导杨树 miR156 表达量下调^[23-24], 而甘蔗抗寒品种 ‘FN39’ 在低温胁迫

下 miR156 表达量上调^[25]。研究发现, miR167 和 ARF(Auxin response factors) 有关, 并且 miR167 通过调控生长素水平抵御冷胁迫^[26]。薄维平等^[27]报道, 低温胁迫会诱导木薯 miR395 的上调表达, 其中 miR395abcd 的上调有利于减轻木薯的低温伤害。Gao 等^[28]发现在番茄中过表达拟南芥 ath-miR399d 可以提高番茄的耐寒性。除了这些保守型 miRNA, 本试验中其他显著差异表达 miRNA 在其他植物低温胁迫中也有过类似报道^[29]。

ICE1 作为关键性抗寒转录因子, 其主导的 ICE1-CBFs-COR 途径是植物响应低温胁迫的重要通路。在该通路中, ICE1 通过与 MYB15^[30] 或 HOS1^[31] 的互作来负调控 CBFs 及其下游基因, 但其通过与 SIZ1^[32] 或 OST1^[33] 的互作来实现正调控。最近, Li 等^[34]报道 MPK3/MPK6 可与 ICE1 相互作用并将其磷酸化, 降低 ICE1 的稳定性及其转录活性, 从而负调控拟南芥 CBF 表达及其抗寒力。本试验进一步筛选到 25 个与该通路相关的 miRNA, 其中, eca-miR-n33 靶向 ICE1, 可正调控 ICE1-CBFs-COR 通路的 miRNA 有靶向 OST1 的 eca-miR5780b-5p、eca-miR390b-5p、eca-miR-n51 和 eca-miR-n60 以及靶向 SIZ1 的 eca-miR482f-3p, 而负调控该通路的 miRNA 有靶向 HOS1 的 eca-miR23a-5p 和 eca-miR-n2 以及靶向 MPK6 的 eca-miR171g-3p 和 eca-miR171j-3p。此外, Li 等^[35]报道 BZR1 可以正调控 CBF1/2, 增强植物抵御低温胁迫的能力。Jiang 等^[36]报道与光形态建成有关的转录因子 PIF3 可与 CBF 启动子直接结合, 实现对低温胁迫的负调控; 而 EBF1(EIN3-BINDING F-BOX 1) 可直接靶向 PIF3 进行 26S 蛋白酶体介导的降解, 提高植物的抗寒力。综上可知, 上述的这些 miRNA 可为后续深入研究其参与调控赤桉低温胁迫应答的分子网络奠定基础。

参考文献:

[1] SHANG X H, ARNOLD R J, WU Z H, et al. Combining quantitative data on growth, wood density and other traits with SSR markers to evaluate genetic diversity and structure in a planted population of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn[J]. *Forests*, 2019, 10(12): 1090.

[2] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

[3] HAUSSE J, ZAVOLAN M. Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(9): 599-612.

[4] SUN Y H, SHI R, ZHANG X H, et al. MicroRNAs in

trees[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(1): 37-53.

[5] LI F, PIGNATTA D, BENDIX C, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1790-1795.

[6] KNIGHT M R, KNIGHT H. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants[J]. *New Phytologist*, 2012, 195(4): 737-751.

[7] SUNKAR R, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001-2019.

[8] 张紫阳, 刘艳, 魏瑞研, 等. 木本植物 miRNAs 参与环境胁迫应答的研究进展[J/OL]. 分子植物育种, 2020(2020-09-11) [2020-11-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200910.1644.004.html>.

[9] LIN Y Z, ZHENG H Q, ZHANG Q, et al. Functional profiling of EcaICE1 transcription factor gene from *Eucalyptus camaldulensis* involved in cold response in tobacco plants[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 23(2): 141-150.

[10] ZHANG Z Y, CHENG L, ZHANG W H, et al. Characterization of transcription activation domain of EcaICE1 and its interaction with EcaSIZ1 in *Eucalyptus camaldulensis*[J]. *Trees*, 2020, 34(5): 1243-1253.

[11] CHENG L, ZHANG W H, HU J L, et al. Characterization of the key region and putative phosphorylation sites of EcaICE1 in its molecular interaction with the EcaHOS1 protein in *Eucalyptus camaldulensis*[J]. *Plant Biology*, 2021, 23(2): 400-406.

[12] LIN Z, LI Q, YIN Q, et al. Identification of novel miRNAs and their target genes in *Eucalyptus grandis*[J/OL]. *Tree Genetics & Genomes*, 2018, 14 (2018-07-19)[2020-11-01]. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1273-x>.

[13] FRIEDLÄNDER M R, MACKOWIAK S D, LI N, et al. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 37-52.

[14] 林元震. R 与 ASReml-R 统计学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2016: 381-415.

[15] WANG L K, FENG Z X, WANG X, et al. DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136-138.

[16] DAI X B, ZHAO P X. psRNATarget: A plant small RNA target analysis server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(2): 155-159.

[17] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.

[18] KANEHISA M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(22): 277-280.

- [19] TIAN T, LIU Y, YAN H Y, et al. agriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(1): 122-129.
- [20] XIE C, MAO X Z, HUANG J J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(2): 316-322.
- [21] SHI Y T, DING Y L, YANG S H. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(7): 623-637.
- [22] ZHOU M Q, TANG W. MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, 294(2): 379-393.
- [23] LU S F, SUN Y H, CHIANG V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus* [J]. *Plant Journal*, 2008, 55(1): 131-151.
- [24] BAO H, CHEN M, CHEN H, et al. Transcriptome-wide identification of miRNA targets and a *TAS3*-homologous gene in *Populus* by degradome sequencing[J]. *Genes & Genomics*, 2019, 41(7): 849-861.
- [25] YANG Y T, ZHANG X, SU Y C, et al. miRNA alteration is an important mechanism in sugarcane response to low-temperature environment[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 818-833.
- [26] 郭鹏, 张万筠, 马红玉, 等. 番茄 Sly-miR167 的抗冷性研究[J]. *西北植物学报*, 2014, 34(7): 1371-1376.
- [27] 薄维平, 曾长英, 宋顺, 等. 木薯耐寒相关 microRNA 的差异表达分析[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(8): 1260-1265.
- [28] GAO N, QIANG X M, ZHAI B N, et al. Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d improves growth under abiotic stress conditions[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2015, 62(3): 360-366.
- [29] 张达巍, 王遂, 高源, 等. microRNA 在植物响应低温胁迫中的作用[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(2): 117-124.
- [30] AGARWAL M, HAO Y, KAPOOR A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(49): 37636-37645.
- [31] DONG, C H, AGARWAL M, ZHANG Y Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(21): 8281-8286.
- [32] MIURA K, JIN J, LEE J, et al. SIZ1-mediated SUMOylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1403-1414.
- [33] DING Y L, LI H, ZHANG X Y, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2015, 32(3): 278-289.
- [34] LI H, DING Y L, SHI Y T, et al. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2017, 43(5): 630-642.
- [35] LI H, YE K Y, SHI Y T, et al. BZR1 positively regulates freezing tolerance via CBF-dependent and CBF-independent pathways in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(4): 545-559.
- [36] JIANG B C, SHI Y T, ZHANG X Y, et al. PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(32): E6695-E6702.

【责任编辑 李晓卉】