

刘金朝, 浦娜, 陈淳, 等. 水稻 lncRNA SVR 及邻近 SAUR 基因在种子低温萌发中的表达 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(6): 896-905.
LIU Jinzhao, PU Na, CHEN Chun, et al. Expression of lncRNA SVR and adjacent SAUR genes in rice during seed germination under low temperature[J].
Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(6): 896-905.

水稻 lncRNA SVR 及邻近 SAUR 基因在种子低温萌发中的表达

刘金朝¹, 浦娜¹, 陈淳¹, 陈伟雄², 王慧¹, 肖武名¹

(1 华南农业大学 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642;

2 广州市农业科学研究院, 广东 广州 510338)

摘要:【目的】长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA) 长度大于 200 nt, 一般不具有编码蛋白质功能。探究低温下 lncRNA 对邻近 SAUR 基因表达的影响, 以期为研究水稻种子低温萌发的能力提供理论依据。【方法】lncRNA SVR 由华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心前期研究筛选, 可以响应低温胁迫, 通过生物信息学方法分析 lncRNA SVR 的二级结构并寻找 lncRNA SVR 内部的冷胁迫基序, 通过 qRT-PCR 分析 lncRNA SVR 和 SAUR 基因的表达特性。【结果】lncRNA SVR 序列中存在高度相似的冷胁迫响应基序, 且在茎环连接处。表达特性分析表明, 在种子萌发过程中低温胁迫会持续降低 lncRNA SVR 的表达, 邻近的多个 SAUR 基因在低温胁迫下的表达量明显高于在常温下的表达量, 表明 lncRNA SVR 的邻近 SAUR 基因一定程度上能够和 lncRNA SVR 一样响应低温胁迫。表达相关性分析表明, 在低温萌发中 lncRNA SVR 与这些 SAUR 基因的表达均呈负相关关系, lncRNA SVR 与 OsSAUR55 的表达呈显著负相关关系。进一步分析种子低温萌发中 SAUR 基因在 lncRNA SVR 敲除系中的表达情况, 结果表明, 在敲除系中, lncRNA SVR 的下降幅度低于其在野生型中的下降幅度, OsSAUR41、OsSAUR53、OsSAUR54、OsSAUR55 表达量的上升幅度均显著低于其在野生型中的上升幅度。【结论】lncRNA SVR 可能负调控 OsSAUR55 的表达, 进而响应低温胁迫。

关键词: 水稻; 长链非编码 RNA; SAUR 基因簇; 低温胁迫; 转录调控; 种子萌发

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)06-0896-10

Expression of lncRNA SVR and adjacent SAUR genes in rice during seed germination under low temperature

LIU Jinzhao¹, PU Na¹, CHEN Chun¹, CHEN Weixiong², WANG Hui¹, XIAO Wuming¹

(1 National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangzhou Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510338, China)

Abstract: 【Objective】Long non-coding RNA (lncRNA) is longer than 200 nt and generally does not code proteins. To explore the effect of lncRNA on the expression of neighbouring SAUR genes under low temperature, and provide a theoretical basis for studying the ability of rice seeds to germinate at low temperature.

收稿日期: 2023-08-22 网络首发时间: 2023-10-17 16:53:19

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20231016.1109.008>

作者简介: 刘金朝, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传与基因功能研究, E-mail: ljz666666@stu.scau.edu.cn; 通信作者: 王慧, 教授, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: wanghui@scau.edu.cn; 肖武名, 副研究员, 博士, 主要从事水稻基因挖掘与遗传育种研究, E-mail: heredity24@126.com

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515010410); 广东省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目 (2022-NPY-00-016)

【Method】lncRNA SVR was investigated in response to cold stress in previous research of National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University. The secondary structure of lncRNA SVR was analysed by bioinformatics, and the cold stress motifs within lncRNA SVR was searched. The expression characteristics of lncRNA SVR and *SAUR* genes were analysed by qRT-PCR. 【Result】In this study, highly similar cold stress response motifs were found in the sequence of lncRNA SVR and at the stem-loop junction. Expression characterization showed that cold stress during seed germination continuously decreased the expression of lncRNA SVR, and the expression of some neighbouring *SAUR* genes was significantly higher under cold stress than that at room temperature, indicating that the neighbouring *SAUR* genes could respond to cold stress to some extent as well as lncRNA SVR. Expression correlation analysis showed that the expression relationship between lncRNA SVR and these *SAUR* genes in low temperature germination were all negatively correlated, and the expression of lncRNA SVR and *OsSAUR55* showed a significant negative correlation. Further analysis of *SAUR* gene expression in low temperature seed germination in the lncRNA SVR knockout lines showed that the decrease of lncRNA SVR in the knockout lines was lower than that in the wild type, and the increase in expression of *OsSAUR41*, *OsSAUR53*, *OsSAUR54* and *OsSAUR55* was significantly lower than that in the wild type. 【Conclusion】lncRNA SVR is able to negatively regulate the expression of *OsSAUR55*, further respond to low temperature stress.

Key words: *Oryza sativa* L.; Long non-coding RNA; *SAUR* gene cluster; Low temperature stress; Transcription regulation; Seed germination

非编码 RNA(Non-coding RNA, ncRNA) 一般指不翻译成蛋白质的 RNA^[1], 包括长链 RNA 和短链小 RNA。其中, 短链非编码 RNA(Small non-coding RNA, microRNA) 和小干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA) 的功能研究较多且作用机制已经比较清楚^[2]; 长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 nt 的非编码 RNA, 不具有编码蛋白质的功能, 直接以 RNA 的形式发挥作用, 可通过染色质重塑、组蛋白修饰、抑制 RNA 聚合酶 II 在表观遗传、转录、转录后、翻译和翻译后水平上调控基因的表达^[3]。随着二代测序技术的发展, 越来越多的 lncRNA 被发现, 据文献报道, 哺乳动物的基因组中有 80% 的转录产物是 lncRNA^[4]。对人类 lncRNA 的研究较深, 比如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾病、心血管疾病、自身免疫疾病等多种疾病的发生和发展与 lncRNA 的异常表达或突变相关^[5]。目前, 在不同的植物中也鉴定出大量的 lncRNA, 但只有很少部分 lncRNA 的功能在一定程度上被阐明, 而对其所在的生化途径和调控水平仍是认知有限, 亟待进一步研究。

根据 lncRNA 的基因组位置, 可将其分为以下几类: 从基因间区域转录出来的 lncRNA, 被称为基因间 lncRNA; 完全从蛋白质编码基因的内含子转

录出来的 lncRNA, 被称为内含子 RNA; 正义 lncRNA 是从蛋白质编码基因的模板链转录而来, 包含来自蛋白质编码基因的外显子, 与部分蛋白质编码基因重叠或通过内含子覆盖蛋白质编码基因的整个序列; 反义 lncRNA 是从蛋白质编码基因的反义链转录而来, 与外显子或内含子区域重叠或通过内含子覆盖整个蛋白质编码序列^[6]。lncRNA 调控基因的作用可分为顺式和反式作用。对于顺式作用的 lncRNA, Kopp 等^[7]猜想了 3 种潜在的机制, 一是 lncRNA 位点可以局部调节基因表达; 二是 lncRNA 转录本本身通过将调控因子募集到位点, 或者调节该因子功能来调节邻近基因的表达; 三是顺式调节仅取决于 lncRNA 启动子或基因位点的 DNA 元件, 完全独立于其产生的 lncRNA。lncRNA 由不同的位置转录而来, 可能具有不同的功能, 这需要我们进一步探索, lncRNA 对基因的调控是顺式还是反式作用一般基于 lncRNA 和基因的相对物理位置, 对邻近基因的调控, 一般称之为顺式调控, 相反, 则为反式调控。本文针对 lncRNA 与邻近基因的顺式作用进行初步研究。

目前, 鉴定到的大部分植物 lncRNA 都与其个体发育有关。这些 lncRNA 在个体发育中通过不同的作用机制来影响基因的表达^[8]。而植物在生长发育过程中, 会受到逆境胁迫, 在胁迫下, lncRNA 的

表达可能比编码蛋白质的 mRNA 更加活跃, 这些 lncRNA 能够作用于蛋白质编码基因, 共同调节植物对逆境胁迫的响应^[9]。张楠等^[10]发现拟南芥中 lncRNA *AtR8* 在萌发种子的根尖端特异表达, 在盐胁迫下, lncRNA *AtR8* 表达下调, 在缺失后能够抑制种子的萌发, 表明 lncRNA *AtR8* 能够参与拟南芥的盐胁迫响应过程。Wang 等^[11]在水稻中鉴定到 lncRNA *LAIR*, 是由邻近基因 *LRK* 基因簇的反义链转录而来, lncRNA *LAIR* 过表达增加水稻籽粒产量并上调几种 *LRK* 基因的表达, lncRNA *LAIR* 结合水稻细胞中的组蛋白修饰蛋白 OsMOF 和 OsWDR5, 使这些蛋白富集在 *LRK1* 基因区域, 从而影响 *LRK* 基因的表达。蔡晶晶^[12]研究发现 lncRNA 13853 正调节拟南芥干旱胁迫耐受性, 其可能是在转录层面调控植物干旱胁迫应答, lncRNA 13853 的表达受到外源 ABA 和 PEG 的抑制。张晓佩^[13]发现在陆地棉中 lncRNA973 受到盐胁迫诱导表达, 而 lncRNA354 受到盐胁迫抑制表达, 研究结果表明, lncRNA354 在棉花中沉默后可能抑制了 H₂O₂ 和 O²⁻ 的积累, 从而增强植株耐盐性, 提高株高及根系干质量; 与对照植株相比, 沉默 lncRNA973 植株的耐盐性降低, lncRNA973 邻近基因在 VIGS 植株中的表达量无明显变化, 它可能通过反式作用调控基因表达来响应盐胁迫。Wang 等^[14]在冷处理葡萄中鉴定出 2 088 个新型 lncRNA 转录本, 预测了 4 个差异表达的葡萄 lncRNA 以顺式调节关系靶向 100 个蛋白质编码基因。Cao 等^[15]研究发现棉花幼苗中具有防御冷胁迫的功能性 lincRNA *XHI23*, 沉默 lincRNA *XHI23* 后, 植物表现出对冷胁迫的敏感性和叶绿体损伤以及活性氧的内源水平增加。Moison 等^[16]研究发现 lncRNA *APOLO* 与转录因子 WRKY42 相互作用并调节其与靶基因 *RHD6* 启动子的结合。Pacheco 等^[17]研究发现 lncRNA *APOLO* 能够结合并积极控制几种细胞壁伸展蛋白编码基因的表达, 并鉴定到 lncRNA *APOLO* 和 WRKY42 的共同靶基因 *EXT3*。总之, 这些被鉴定出来的 lncRNA 都能够通过调控相关基因来响应非生物胁迫。

华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心在前期研究中对水稻野生型品种 ‘Francis’ 种子进行常温和低温萌发处理, 通过全转录组测序鉴定到 lncRNA MSTRG.182510.4 响应低温胁迫, 遂命名为 lncRNA SVR(Seed vigor related lncRNA), 其在种子中表达量较高^[18], 通过对其上下游 100 kb 附近的基因进行相关性分析, 发现在 lncRNA

SVR 上游 2 kb 左右存在 1 个 *SAUR* 基因簇, 包含 *Os09g0545300*、*Os09g0545400*、*Os09g0545700*、*Os09g0547033*、*Os09g0546100*、*Os09g0546200*、*Os09g0546700*、*Os09g0546900*、*Os09g0547000*、*Os09g0547100* 共 10 个 *SAUR* 家族基因, 这些基因可能是 lncRNA SVR 的顺式作用靶基因。因此, 本研究将进一步揭示 lncRNA SVR 在低温下与这些可能的顺式作用基因的转录调控关系, 为下一步研究 lncRNA SVR 通过顺式作用调控靶基因响应逆境胁迫的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 种子常温和低温萌发处理

试验使用的野生型材料为耐寒粳稻品种 ‘Francis’, 转基因材料为 2 个敲除株系 *crlnc-5*、*crlnc-11*。在每个培养皿 (直径 9 cm) 中放入饱满、完好无损的干种子 50 粒, 加入 10 mL 蒸馏水。常温处理放置在 (25±1) °C 恒温培养箱中黑暗处理, 在 0、1、3、5、7 d 取样 (常温下 9、11 d 已长成明显的幼苗, 故不再取样), 每次取 6 粒种子; 低温处理放置在 (15±1) °C 恒温培养箱中黑暗处理, 在 0、1、3、5、7、9、11 d 取样, 每次取 6 粒种子。取样后的种子用锡纸包好, 迅速放置液氮中, 然后移入 -80 °C 条件下保存备用。常温和低温每个时间点均开展 3 次生物学重复。

1.2 基因表达分析

采用 qRT-PCR 技术对 lncRNA SVR 和邻近的 *SAUR* 基因簇进行表达分析。将种子放在研钵中, 加入液氮研磨至粉末状, 使用美基生物科技有限公司的植物 RNA 快提试剂盒 (货号: R4014-02) 提取水稻种子总 RNA, 使用艾科瑞公司 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 (AG11728) 进行 mRNA 的反转录, 使用诺唯赞公司荧光定量试剂盒 (Q111-02) 进行 qRT-PCR, 反应体系为 20 μL, 其中 2×AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL、正反向引物各 0.5 μL、50× ROX Reference Dye1 0.4 μL、模板 cDNA 2.0 μL、ddH₂O 6.6 μL。以 *OsActin* (*Os03g0718100*) 为内参, 使用荧光定量 PCR 仪 (ABI StepOne) 进行基因表达量检测, 每个基因进行 3 次生物学重复。本研究用于基因表达分析的引物信息如表 1 所示。

1.3 lncRNA SVR 冷胁迫基序比对和二级结构预测

使用 EMBL 在线网站 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) 开展冷胁迫基序的比对分析, 使用 RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) 进行

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 qRT-PCR primers used in this study

名称 Name	ID/基因 Gene	序列(5'→3') Sequence
lncRNA SVR(用于时空表达 For temporal and spatial expression)	MSTRG.182510.4	F: TCTGTGCGATGAGACTCAAGGAG
		R: AGCCCATAACGTCATGCTTGC
lncRNA SVR(用于基因敲除材料 For gene knocked out material)	MSTRG.182510.4	F: TTCACAAGAGACTGTCCCATCGTA
		R: TGCTACGAGAACCACGTTTGC
<i>OsActin</i>	<i>Os03g0718100</i>	F: GAATGCTAAGCCAAGAGGAG
		R: AATCACAAGTGAGAACCACAG
<i>OsSAUR39</i>	<i>Os09g0545300</i>	F: CCATGATCAATCCTAAGAGGCT
		R: TGATCTTTTCCTCACCTGTGAA
<i>OsSAUR40</i>	<i>Os09g0545400</i>	F: ATCTTGATTTGTGTAGCATCGC
		R: GACAACAACCTGACTAGACTGA
<i>OsSAUR41</i>	<i>Os09g0545700</i>	F: ACCTCTCCCCATGTTCTGGT
		R: ACCCTGAAGGCGACTATTGC
<i>OsSAUR44</i>	<i>Os09g0547033</i>	F: TTGTGTCTGCTTAGGAGAGATG
		R: TGTACAAACAGCAAGTTGATGG
<i>OsSAUR45</i>	<i>Os09g0546100</i>	F: CAGCTGAAACCAAGATCAACAA
		R: GTGCAGCACTCTTCATTTTCTT
<i>OsSAUR46</i>	<i>Os09g0546200</i>	F: GAGACTGGTTCAATTGGCAAAG
		R: GAGCATTCTTCAGTTTCTTGCG
<i>OsSAUR51</i>	<i>Os09g0546700</i>	F: GATGGCCTACCTCGTGCTGTG
		R: GCATTTGTTGGAGACAAGGC
<i>OsSAUR53</i>	<i>Os09g0546900</i>	F: GAGTATGTCCTGTGCTTGCTTA
		R: CAAGATTTCACAATGGTGCTCA
<i>OsSAUR54</i>	<i>Os09g0547000</i>	F: CCACAGCGTATGTCGCAGA
		R: GATCGCCGTGTTGAGGTACA
<i>OsSAUR55</i>	<i>Os09g0547100</i>	F: AGAAATGGCGAAGGATGGCA
		R: AACCTTGGGCTTCTCCGTC

RNA 二级结构预测。

1.4 数据分析和作图

用 Excel 2016 对所有的定量数据整合分析, 采用相对定量方法进行分析^[19], 将数据导入 GraphPad Prism 9.5, 进行学术绘图。

2 结果与分析

2.1 lncRNA SVR 序列中存在冷胁迫响应基序

二级结构预测结果表明, lncRNA SVR 的最佳二级结构为典型的茎环结构, 包含 4 个稍大一点的环与多个较小的环, 最小自由能为-716.36 kJ/mol (图 1A)。Di 等^[20]使用 RNApromo 预测了由共表达网络分组的 lncRNA 中的保守结构基序, 有 25 组, 共 80 个 lncRNA, 其中发现了一些与胁迫相关的结构基序。例如, 发现富含 AU 的茎环 (AUC=0.948,

$E=3.1\times10^{-4}$, $P<0.001$) 对冷胁迫有反应, 该冷胁迫响应保守基序为 AGAGAAAGAAAG, 这些保守基序可能是导致 RNA 分子响应胁迫的原因。使用 EMBL Water 的史密斯-沃特曼算法对冷胁迫响应基序和 lncRNA SVR 序列进行比对, 发现 lncRNA SVR 转录区域内的序列 AGAAAAAGAAAC 和该保守基序相似性达 83.3%(10/12), 该基序位于其二级结构的茎环相连接处 (图 1B)。分析结果表明, lncRNA SVR 内部存在与已经报道的冷胁迫响应基序高度相似性的序列, 这说明 lncRNA SVR 可能会响应低温逆境胁迫。

2.2 常温和低温下水稻种子中 lncRNA SVR 的表达特性

前期研究发现 lncRNA SVR 在水稻种子中呈现组织特异表达特性, 为了进一步验证 lncRNA

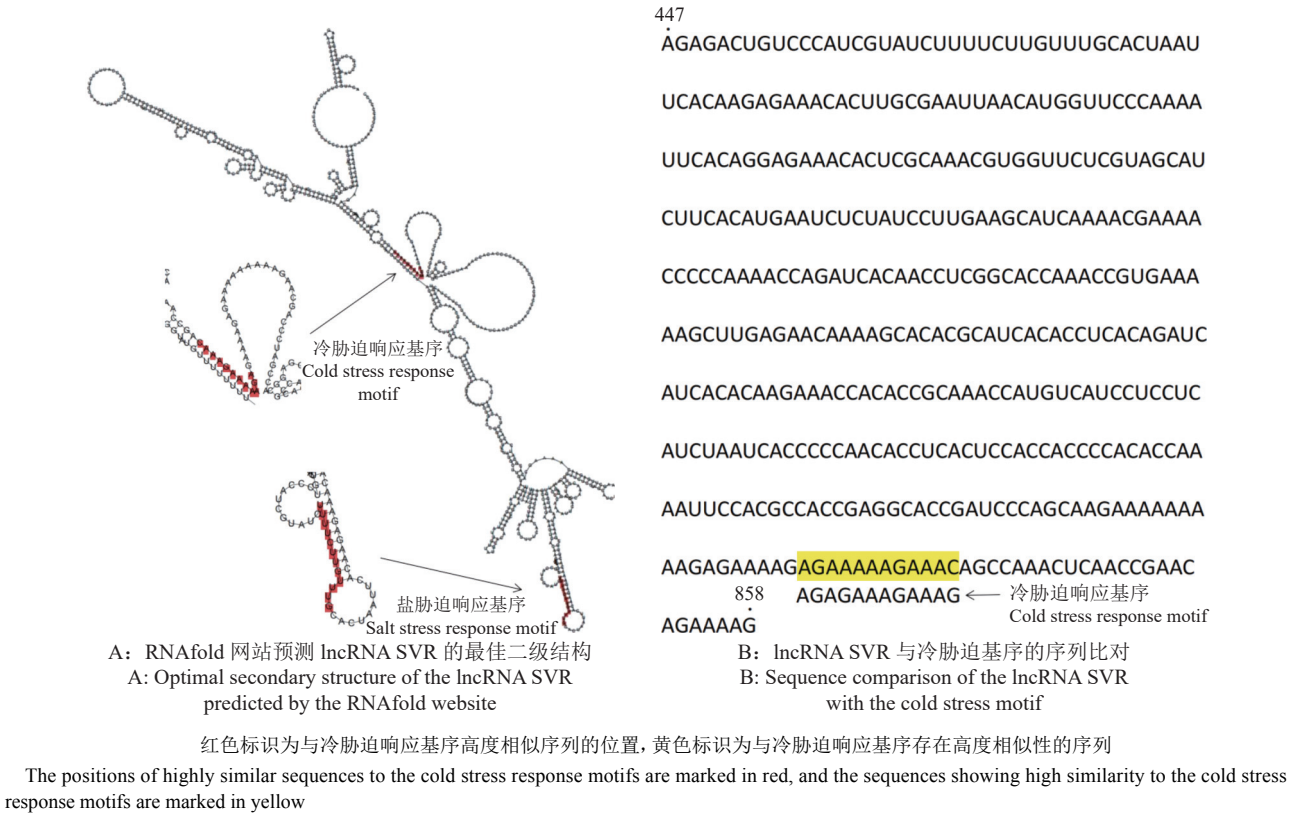


图 1 lncRNA SVR 序列中存在的冷胁迫响应基序
Fig. 1 Cold stress response motif in lncRNA SVR

SVR 是否响应低温胁迫, 本研究对野生型材料种子进行常温萌发和低温萌发处理, 检测 lncRNA SVR 在不同环境中的表达动态。结果 (图 2) 发现, 在低温条件下, lncRNA SVR 的表达量在干种子 (0 d) 中最高, 随后均处于明显降低的状态, 但 1 d 的表达量仍明显高于之后的时间点; 在常温下, 1 d 的表达量不但略高于 0 d 的表达量, 还明显高于 3、5 和 7 d 的表达量, 且 3、5 和 7 d 的表达量基本接近。总体而言, 1、3、5、7 d 该 lncRNA SVR 在常温下的表达量均明显高于其在低温下对应时间

点的表达量。可见, 在种子萌发过程中低温逆境可抑制 lncRNA SVR 的表达, 说明 lncRNA SVR 在种子萌发过程中响应低温胁迫。

2.3 常温和低温下 lncRNA SVR 的邻近 SAUR 基因的表达特性

采用 qRT-PCR 分析 lncRNA SVR 上游 SAUR 基因簇中各个基因的表达特性, 结果 (图 3) 表明: *OsSAUR39* 和 *OsSAUR40* 在常温下的表达量随着萌发时间的增加而逐步上升, 且 7 d 的表达量最高; 而在低温下 *OsSAUR39* 在 5 d 的表达量最高, *OsSAUR40* 在 3、5、7 d 的表达量高于 1 d、低于 0 d。 *OsSAUR41* 在常温下 1、3、7 d 的表达量较为接近且处于较高的水平, 是 0、5 d 的数十倍; 而在低温下 5、7 d 的表达量明显高于 0、1、3 d, 仍明显低于常温 1、3、7 d 的表达水平。 *OsSAUR44* 在常温下 1、3、5、7 d 的表达量均高于 0 d, 且 1 d 的表达量最高; 在低温下, 3、5、7 d 的表达量明显高于 0、1 d, 总体上高于常温下萌发的表达水平, 说明该基因在萌发过程中受到了低温的强烈诱导。 *OsSAUR45* 在常温下 1、3、5、7 d 的表达量基本没有变化且均明显低于 0 d; 其在低温下 5、7 d 的表达量明显高于 1、3 d, 但仍低于 0 d 的表达量, 总体上低温下的表达水平高于常温, 可见该基因在萌发过程中也受到

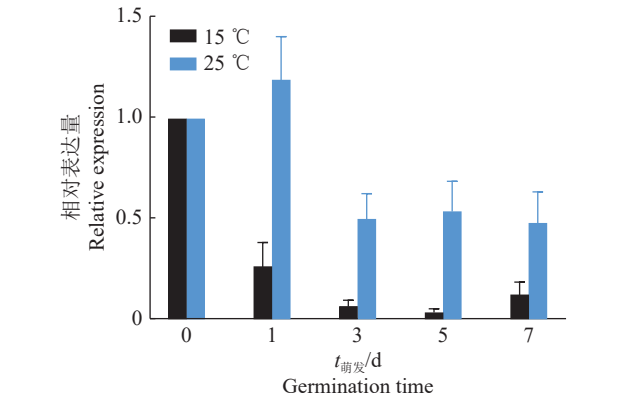


图 2 lncRNA SVR 在常温和低温萌发中表达的动态变化
Fig. 2 Dynamic changes of lncRNA SVR expression in seed germination at room and low temperatures

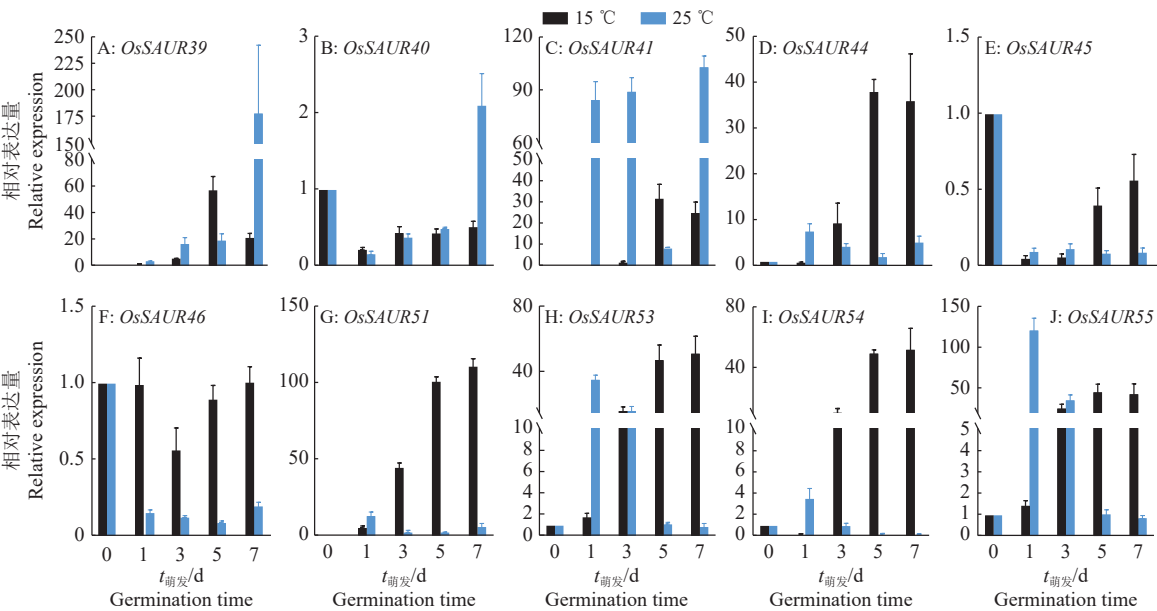


图3 SAUR 基因簇在常温和低温的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of SAUR gene cluster at room and low temperature

了低温的诱导。*OsSAUR46* 在常温下 1、3、5、7 d 的表达量无明显差异, 但均低于 0 d; 其在低温下 0、1 d 的表达水平基本接近, 在 3、5、7 d 的表达量基本保持与 0 d 相同的水平, 且低温下的表达水平明显高于常温, 说明该基因在低温萌发过程也受到了一定的诱导。*OsSAUR51* 与 *OsSAUR54* 在常温下 1 d 的表达量高于其他时间点, 在低温下 3、5、7 d 的表达量均上升到较高的水平, 总体而言其在低温下的表达水平明显高于常温, 说明这 2 个基因在萌发过程中也受到了低温的强烈诱导。*OsSAUR53* 与 *OsSAUR55* 在常温下 1、3 d 的表达水平维持在较高水平, 5、7 d 的表达水平与 0 d 较为接近, 均呈现较低的状态; 在低温下 3、5、7 d 的表达量上升到较高的水平, 明显高于 0、1 d, 这表明在种子萌发后期, 该基因受到低温的持续诱导。

以上结果表明, *OsSAUR39*、*OsSAUR40*、*OsSAUR41*、*OsSAUR44*、*OsSAUR45*、*OsSAUR46*、*OsSAUR51*、*OsSAUR53*、*OsSAUR54*、*OsSAUR55* 在常温和低温萌发下的表达水平差异较大, 其中, *OsSAUR44*、*OsSAUR46*、*OsSAUR51*、*OsSAUR53*、*OsSAUR54*、*OsSAUR55*, 在萌发过程中均受到了低温的诱导, *OsSAUR44* 在低温处理后 5、7 d 表达量最高, 低温处理可以持续诱导 *OsSAUR46* 并使其表达量维持在一定水平, *OsSAUR51* 与 *OsSAUR54* 也受到低温的强烈诱导, 二者在低温下的表达变化情况较为相似, *OsSAUR53* 与 *OsSAUR55* 在种子萌发后期也受到低温的强烈诱导且呈现出相似的表达

趋势。虽然这些邻近基因属于同一个 SAUR 基因簇, 但是在常温和低温下的表达特性存在很大区别, 分析这些基因在不同温度及不同萌发时间点表达的动态变化, 对进一步研究 SAUR 基因簇响应冷胁迫功能具有较大的参考意义。

2.4 低温下 lncRNA SVR 与 SAUR 基因表达的相关性

在前面的研究中, 我们分析了常温和低温下野生型材料中 lncRNA SVR 和 SAUR 基因簇中各个基因的表达情况, 推测 lncRNA SVR 和 SAUR 基因可能会响应低温胁迫, 为进一步明确它们之间的调控关系, 有必要开展低温下 lncRNA SVR 与 SAUR 基因表达的相关性分析。以低温下 lncRNA SVR 和 SAUR 基因 0 d 时的表达量作为对照, 选择了 6 个数据点 (1、3、5、7、9、11 d) 进行相关性分析, 结果 (图 4) 表明, lncRNA SVR 的表达与 *OsSAUR39*、*OsSAUR45*、*OsSAUR51*、*OsSAUR53*、*OsSAUR55* 的表达负相关关系明显, 其中 lncRNA SVR 与 *OsSAUR55* 的表达呈现显著的负相关关系, 因此, lncRNA SVR 可能与这些 SAUR 基因存在某种调控机制, 值得进一步探索。

2.5 lncRNA SVR 与 SAUR 基因的转录调控

前期研究通过 Cas9/CRISPR 技术创制了 lncRNA SVR 的 2 个纯合突变体, 分别为 *crlnc-5* (ACTT 缺失)、*crlnc-11* (T 缺失), 如图 5 所示。为了进一步探究低温胁迫下 lncRNA SVR 与 SAUR 基因的表达调控关系, 对低温处理 2、4 d 后不同

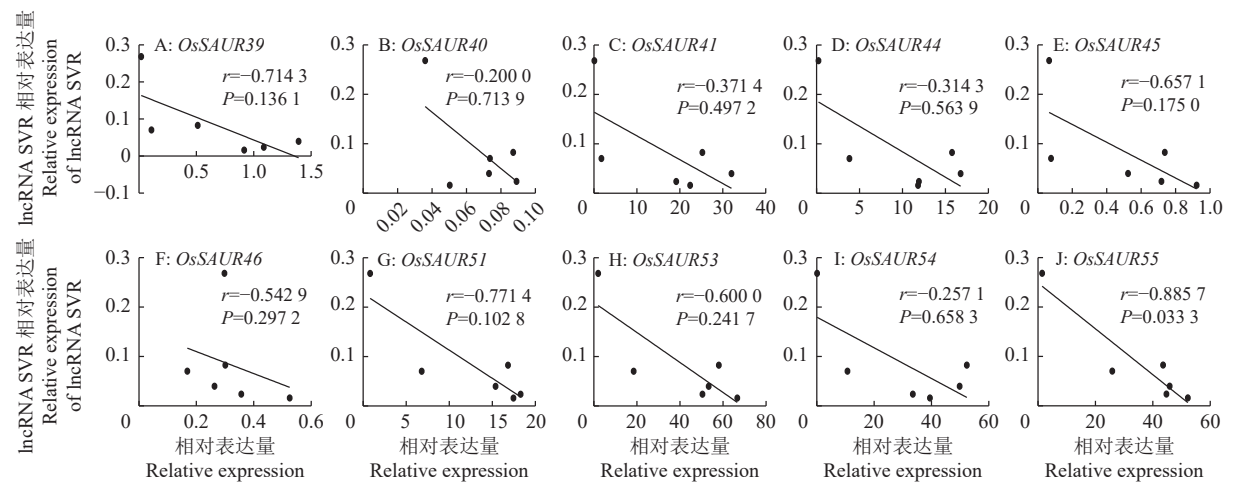


图 4 lncRNA SVR 和 SAUR 基因簇表达的相关性分析

Fig. 4 Expression correlation analysis of lncRNA SVR and SAUR genes

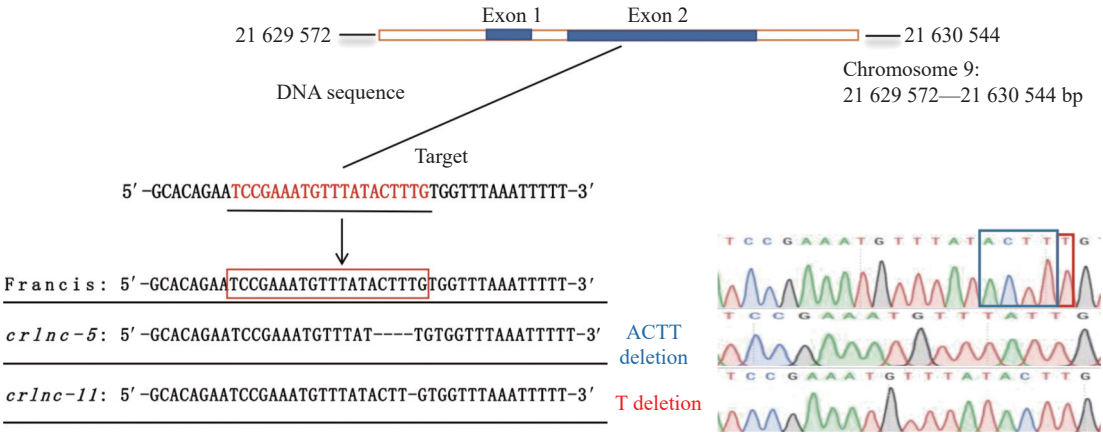


图 5 lncRNA SVR 突变体的靶点序列

Fig. 5 Target sequences of the lncRNA SVR mutants

lncRNA SVR 敲除材料中 SAUR 基因的表达水平进行分析。结果 (图 6) 表明, 在野生型材料和敲除材料中, 4 d 时 lncRNA SVR 的表达量均低于 2 d 的表达量, 但在野生型中 lncRNA SVR 表达量的下降幅

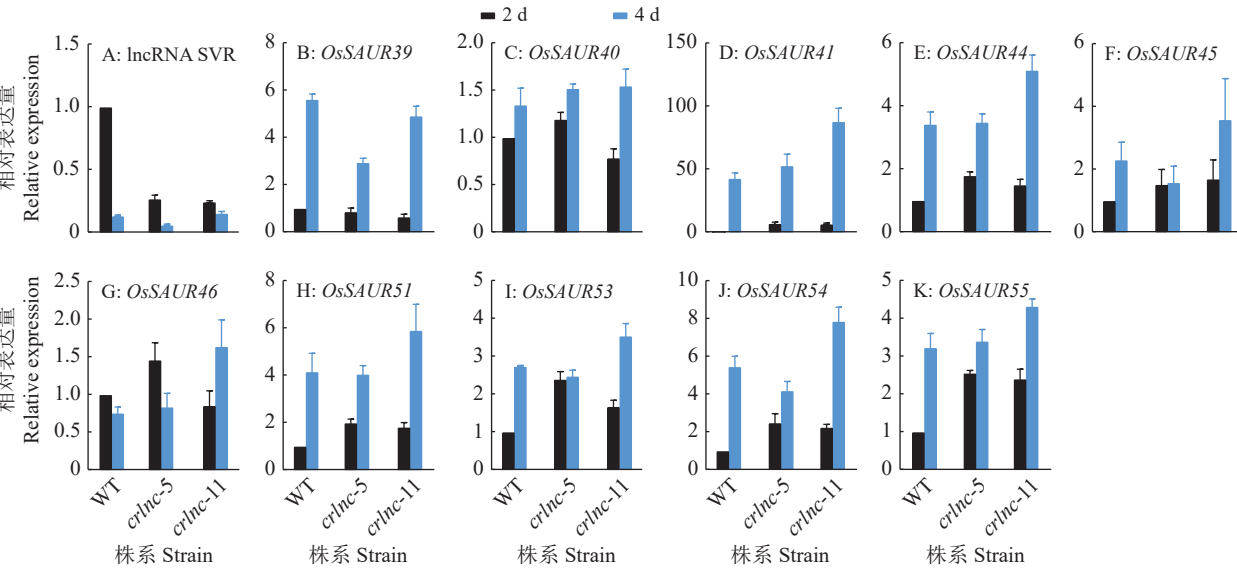


图 6 不同 SAUR 基因在 lncRNA SVR 转基因材料中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of different SAUR genes in lncRNA SVR transgenic materials

度明显高于在敲除材料中的下降幅度, 这意味着敲除 lncRNA SVR 能够减小低温下 lncRNA SVR 表达水平的下降幅度。除了 *OsSAUR46* 外, 与低温处理 2 d 相比, *OsSAUR39*、*OsSAUR40*、*OsSAUR41*、*OsSAUR44*、*OsSAUR45*、*OsSAUR51*、*OsSAUR53*、*OsSAUR54*、*OsSAUR55* 在处理 4 d 野生型和 lncRNA SVR 突变体材料中的表达量均上升, 考虑到 lncRNA SVR 表达量的下降趋势, 它们之间的关系与前文描述的负相关较为吻合。因此, 进一步分析 lncRNA SVR 在不同低温处理时间的表达对 *SAUR* 基因表达的影响, 推测 lncRNA SVR 表达量

下降的幅度越大, *SAUR* 基因的表达量上升的幅度越大, 相反, lncRNA SVR 表达量下降的幅度越小, *SAUR* 基因的表达量上升的幅度也越小。因此, 我们在野生型和 lncRNA SVR 突变体材料中分析 *SAUR* 基因的表达变化, 结果 (图 7) 表明, 与低温处理 2 d 相比, 低温处理 4 d 时, *OsSAUR41*、*OsSAUR53*、*OsSAUR54*、*OsSAUR55* 在 lncRNA SVR 突变体中的表达量上升幅度均在 $P < 0.01$ 水平显著低于在野生型中的上升幅度, 而其他 *SAUR* 基因的表达特性并不呈现明显的规律性。

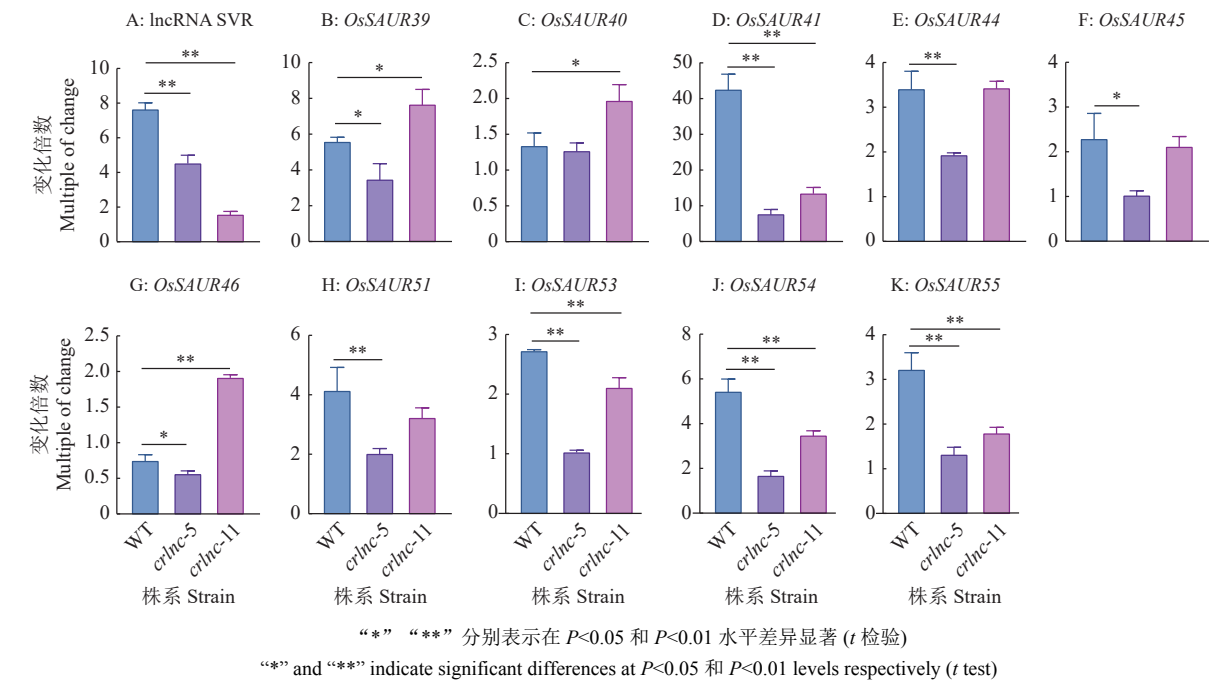


图 7 不同 *SAUR* 基因在 lncRNA SVR 转基因材料中的表达变化
Fig. 7 Expression changes of different *SAUR* genes in lncRNA SVR transgenic materials

3 讨论与结论

低温胁迫会影响水稻种子萌发, 进而导致出苗率降低, 产量下降。 *SAUR* 基因家族是植物特有的、生长素响应因子中最大的一个家族, 而且能够在生长素诱导的早期做出响应, 是生长素早期应答的三大基因家族之一^[21]。目前, 对 *SAUR* 基因家族的研究在经济作物和模式作物中取得了一定的进展。Chae 等^[22] 研究发现, 表达 *SAUR63:GFP* 或 *SAUR63:GUS* 融合的转基因拟南芥的下胚轴、花瓣和雄蕊丝更长, 表明这些蛋白质融合导致功能增强, *SAUR63:GFP* 和 *SAUR63:GUS* 幼苗在下胚轴中积累的生长素含量也高于野生型幼苗。吴春梅^[23] 研究发现, 常温 (22 °C) 条件下培养 4 周, *35S::SAUR16* 叶片数目和鲜质量较 Col-0 显著减少, *35S::SAUR6*、

35S::SAUR14 则无显著差异; 低温 (4 °C) 条件下植物生长缓慢, 培养 12 周后所有 *SAUR* 转基因植株的叶片数目和鲜质量与 Col-0 相比均无显著差异。以上结果表明, *SAUR6*、*SAUR14* 和 *SAUR16* 虽然属于同一基因家族, 但不同 *SAUR* 基因对拟南芥生长的作用不同。翟立升^[24] 研究表明 T_1 代 *OsSAUR10* 过量表达转基因植株苗期矮小、根系短, CRISPR 敲除系种子的萌发率、结实率、分蘖数都降低, 且在苗期矮小, 说明 *OsSAUR10* 正向调控水稻种子萌发和苗期生长, 超表达系和 CRISPR 敲除系在苗期的表型相似可能是由于响应不同的激素途径导致的。李明发^[25] 分析发现 *SAUR15* 的 T-DNA 插入缺失突变体 *saur15-1* 的萌发速度低于野生型 Col-0, 而超表达植株 *pSAUR15::SAUR15-FLAG* 与 *35S::SAUR15-FLAG* 的萌发速度均高于

Col-0; 组织定位分析结果显示 *SAUR15* 在种子各萌发阶段中广谱表达, 以上结果表明 *SAUR15* 在种子萌发过程中发挥正调控作用。*SAUR* 基因家族属于生长素信号途径中的重要成员, 生长素是植物中最重要的一种信号分子, 调控植物生长发育的各个方面, 生长素通过多条平行的途径被生物合成和失活, 也通过典型和非典型途径被感受和转导, 生长素在种子休眠和萌发中的作用主要受其生物合成与分解代谢以及信号转导途径的调控^[26]。lncRNA 对 *SAUR* 基因的调控鲜有报道, Sun 等^[27] 研究发现 MSTRG.85814 的剪接变体 MSTRG.85814.11 正向调节且顺式靶向生长素上调基因 *SAUR32*, 使用 pH 成像技术, 观察到 MSTRG.85814.11 和 *SAUR32* 过表达苹果植株根尖质外体的 pH 显著降低, MSTRG.85814.11 被证明可以积极促进 *SAUR32* 的表达, 揭示了 lncRNA 促进植物在缺铁胁迫下的响应机制。

本研究中, 我们发现 lncRNA SVR 序列中存在冷胁迫响应基序, 且在茎环连接处; 对 lncRNA SVR 的表达特性分析表明, 低温胁迫会持续降低 lncRNA SVR 的表达; 还发现在种子萌发过程中 lncRNA SVR 邻近的多个 *SAUR* 基因在低温胁迫下的表达量明显高于其在常温下的表达量, 这表明 lncRNA SVR 的邻近 *SAUR* 基因簇一定程度上能够和 lncRNA SVR 一样响应低温胁迫; 低温胁迫下表达的相关性分析表明, lncRNA SVR 的表达与 *OsSAUR39*、*OsSAUR45*、*OsSAUR51*、*OsSAUR53*、*OsSAUR55* 表达的负相关关系明显, 其中, lncRNA SVR 与 *OsSAUR55* 的表达呈现显著的负相关关系, 值得注意的是, 在低温下, lncRNA SVR 与这些 *SAUR* 基因的表达关系均呈现负相关, 这表明 lncRNA SVR 可能会顺式靶向且负调控 *SAUR* 基因的表达。因此, 我们分析野生型种子和 lncRNA SVR 突变体种子低温处理 2、4 d 时 lncRNA SVR 和 *SAUR* 基因的表达关系, 发现 lncRNA SVR 在突变体材料中表达量的下降幅度极显著低于在野生型中的下降幅度。前面我们推测 lncRNA SVR 对 *SAUR* 基因可能存在负调控作用, 低温 4 d 与低温 2 d 相比, 在 lncRNA SVR 突变体中, 随着 lncRNA SVR 的表达量下降, *SAUR* 基因表达量应呈上升趋势。因此我们进一步分析了 *SAUR* 基因的表达情况, 结果表明, *OsSAUR41*、*OsSAUR53*、*OsSAUR54*、*OsSAUR55* 在 lncRNA SVR 突变体中的表达量均上升, 而且上升幅度极显著低于其在野生型中的上升幅度, 这可能是由于 lncRNA SVR 在

突变体中的下降幅度低于其在野生型的下降幅度所致。总之, 根据在低温下 lncRNA SVR 和 *SAUR* 基因表达的相关性分析和 *SAUR* 基因在 lncRNA SVR 突变体中的表达量分析, lncRNA SVR 很有可能负调控 *OsSAUR55* 的表达, 进而响应低温胁迫。

目前, lncRNA 对 *SAUR* 基因家族的调控鲜见报道, 对 lncRNA 调控功能基因的机制更是知之甚少。本研究对 lncRNA SVR 突变体和野生型材料中 lncRNA SVR 和 *SAUR* 基因开展表达动态变化研究, 能更准确地表明 lncRNA SVR 与 *SAUR* 基因在低温下的表达动态, 进而分析 lncRNA SVR 对 *SAUR* 基因的调控关系, 相比在单一时间点研究 lncRNA SVR 与 *SAUR* 基因的表达关系更为准确。有研究报道表明, lncRNA 对基因的表达调控与正常的编码蛋白基因不同, lncRNA SVR 是如何通过调控基因的表达来发挥功能, 进而响应逆境胁迫, 可能存在更复杂的调控机制, 对于其中调控机理的研究, 值得进一步探索。

参考文献:

[1] 杨贺, 张楠, 刘自广, 等. 低温胁迫下结球甘蓝 *BoNR8* lncRNA 过表达对拟南芥种子萌发的影响[J]. 植物研究, 2020, 40(3): 441-446.

[2] FU X D. Non-coding RNA: A new frontier in regulatory biology[J]. *National Science Review*, 2014, 1(2): 190-204.

[3] WASEEM M, LIU Y, XIA R. Long non-coding RNAs, the dark matter: An emerging regulatory component in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 86. doi: 10.3390/ijms22010086.

[4] KAPRANOV P, CHENG J, DIKE S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1484-1488.

[5] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases[J]. *Cancer Letters*, 2013, 339(2): 159-166.

[6] MA L, BAJIC V B, ZHANG Z. On the classification of long non-coding RNAs[J]. *RNA Biology*, 2013, 10(6): 925-934.

[7] KOPP F, MENDELL J T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.

[8] 王彬, 陈敏氢, 白昌辉, 等. 长链非编码 RNA 在植物生长发育和逆境胁迫响应中的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(1): 153-163.

[9] 郑佳秋, 吴永成, 王薇薇, 等. 植物逆境相关长链非编码 RNA 的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 19-23.

[10] 张楠, 刘自广, 孙世臣, 等. 拟南芥 *AtIR8* lncRNA 对盐胁迫响应及其对种子萌发的调节作用[J]. 植物学报, 2020, 55(4): 421-429.

[11] WANG Y, LUO X, SUN F, et al. Overexpressing lncRNA *LAIR* increases grain yield and regulates neighbouring gene cluster expression in rice[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3516. doi: 10.1038/s41467-018-05829-7.

[12] 蔡晶晶. 长链非编码 RNA13853 调控拟南芥干旱胁迫应答机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.

[13] 张晓佩. 陆地棉长链非编码 RNAs-lncRNA354 和 lncRNA973 的功能和作用机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.

[14] WANG P, DAI L, AI J, et al. Identification and functional prediction of cold-related long non-coding RNA (lncRNA) in grapevine[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 6638. doi: 10.1038/s41598-019-43269-5.

[15] CAO Z, ZHAO T, WANG L, et al. The lincRNA *XHI23* is involved in cotton cold-stress regulation[J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 106(6): 521-531.

[16] MOISON M, PACHECO J M, LUCERO L, et al. The lncRNA *APOLO* interacts with the transcription factor WRKY42 to trigger root hair cell expansion in response to cold[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(6): 937-948.

[17] PACHECO J M, MANSILLA N, MOISON M, et al. The lncRNA *APOLO* and the transcription factor WRKY42 target common cell wall EXTENSIN encoding genes to trigger root hair cell elongation[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2021, 16(8): 1920191. doi: 10.1080/15592324.2021.1920191.

[18] GAO Q, LIU J, WENG H, et al. A long noncoding RNA derived from lncRNA-mRNA networks modulates seed vigor[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9472. doi: 10.3390/ijms23169472.

[19] 管健. 应用 Real Time PCR 法进行 mRNA 表达量相对定量分析方法的探讨[J]. 现代园艺, 2014(5): 4-5.

[20] DI C, YUAN J, WU Y, et al. Characterization of stress-responsive lncRNAs in *Arabidopsis thaliana* by integrating expression, epigenetic and structural features[J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(5): 848-861.

[21] 朱宇斌, 孔莹莹, 王君晖. 植物生长素响应基因 *SAUR* 的研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(4): 407-413.

[22] CHAE K, ISAACS C G, REEVES P H, et al. *Arabidopsis* *SMALL AUXIN UP RNA63* promotes hypocotyl and stamen filament elongation[J]. *The Plant Journal*, 2012, 71(4): 684-697.

[23] 吴春梅. 拟南芥生长素响应基因 *SAUR6*、*SAUR14* 和 *SAUR16* 对抗冻的作用和机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.

[24] 翟立升. 水稻 *OsSAUR10* 的表达和功能研究及水稻胚芽特异表达基因的生物信息学分析[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019.

[25] 李明发. *SAUR15* 在种子萌发中的功能及分子机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.

[26] 宋松泉, 刘军, 唐翠芳, 等. 生长素代谢与信号转导及其调控种子休眠与萌发的分子机制[J]. 科学通报, 2020, 65(34): 3924-3943.

[27] SUN Y, HAO P, LV X, et al. A long non-coding apple RNA, MSTRG. 85814.11, acts as a transcriptional enhancer of *SAUR32* and contributes to the Fe-deficiency response[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(1): 53-67.

【责任编辑 李庆玲】