

吴 斌, 崔汉青, 张 眉, 等. 玉米抗感粗缩病重要 miRNA 及其靶基因的诠释[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(20): 64-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.20.009

玉米抗感粗缩病重要 miRNA 及其靶基因的诠释

吴 斌¹, 崔汉青², 张 眉¹, 邵春国², 姜珊珊¹, 郭 霞¹, 徐德坤³, 王升吉¹

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所/山东省植物病毒学重点实验室, 山东济南 250100;

2. 山东省平度市职业中等专业学校, 山东平度 266752; 3. 山东省临沂市农业技术推广服务中心, 山东临沂 276000)

摘要:借助高通量测序和生物学分析手段, 筛选不同抗性品种间的差异表达 miRNA, 预测相关靶基因。对玉米抗、感粗缩病不同种质材料高通量测序鉴定出的差异 miRNA 的靶基因, 在 Genome、Gene Ontology 等生物信息数据库中进行比对, 同时做 GO (Gene Ontology, 简称 GO)、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 简称 KEGG) 富集性分析。从某些相关差异 miRNA 的靶基因及其作用位点的有关 GO ID 及其生物学功能注释中, 发现一些可能与玉米粗缩病抗性有较大关系的 miRNA, 如 zma-miR156a、zma-miR156k、zma-miR1432 等; 通过进一步的 miRNA 靶基因 KEGG 富集性分析, 获得代谢通路 ID, 根据其生物学功能注释, 推测也有一定数量的 miRNA 与玉米种质抗(感)病相关。结合所涉差异 miRNA 在玉米抗、感种质接毒前后上、下调的表现, 对这些重要 miRNA 靶基因可能涉及粗缩病的致病机制或玉米抗性相关的 GO ID、KEGG 通路 ID 所蕴含的功能进行了诠释。研究旨在探明抗病相关 miRNA 通过靶向作用其靶基因, 在抗病过程中可能发挥的重要生物学功能和作用途径, 研究结果可为探讨玉米抗粗缩病的抗病机制研究奠定理论基础。

关键词:玉米粗缩病; 差异 miRNA; 高通量测序; 靶基因; 富集分析

中图分类号:S435.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)20-0064-06

玉米粗缩病 (maize rough dwarf virus, 简称 MRDV) 是玉米生产中一类重要的病害, 严重影响了玉米生产^[1]。该病由带毒灰飞虱传播病毒, 在山东省, 其主要毒原为水稻黑条矮缩病病毒 (rice black-streaked dwarf virus, 简称 RBSDV)^[2-3]。前期研究发现, 种植抗病品种是防治该病的重要措施, 因此, 发掘玉米粗缩病抗性相关基因、微小核糖核酸 (miRNA) 或反式作用干扰小 RNA (ta-siRNA) 等, 分析其功能进而探究其抗病机制, 可为抗病品种的遗传改良提供理论依据和技术支持。

miRNA 是真核生物体内的一类负调控因子, 在植物生长发育调节和病害防御中具有重要作用^[4]。病毒在侵染寄主植物的过程中能够诱导大量 miRNA 产生, 这些 miRNA 在病毒侵染时上调或下

调表达, 通过抑制防卫反应中的负调控因子和促进防卫反应中的正调控因子来行使功能。Wu 等发现, 水稻条纹病毒侵染水稻后, miR168 与 AGO18 互作, 调控水稻体内 AGO1 的表达, 进而表现出抗病^[5]。

本研究对 RBSDV 侵染不同抗性玉米品种所获叶片、茎秆组织进行 miRNA 高通量测序, 对鉴定出的重要差异表达 miRNA 的靶基因开展 GO、KEGG 富集性分析, 对其在玉米抗粗缩病中的生物学功能进行阐述和讨论, 以期探究其在抗病过程中发挥的重要生物学功能和作用途径, 进而为研究玉米抗粗缩病的抗病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

主要材料如下: 玉米抗、感粗缩病品种分别为农大 108、郑单 958; 感染水稻黑条矮缩病病毒 (RBSDV) 的水稻 (或小麦) 病株; 人工养殖 2~3 龄的灰飞虱无毒若虫; 小麦易感病品种; 健康水稻幼苗。

1.2 试验方法

1.2.1 测序用玉米病株、健康株的获得 该工作是

收稿日期: 2021-02-11

基金项目: 山东省重点研发计划 (编号: 2018GSF121029); 国家重点研发计划 (编号: 2018YFD0200603); 山东省农业科学院农业科学创新工程 (编号: CXGC2016B11-绿色防控)。

作者简介: 吴 斌 (1986—), 男, 山东临清人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: wubin228@126.com。

通信作者: 王升吉, 硕士, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: shjiw@163.com。

通过人工接 RBSDV 方法完成的,主要包括以下几个步骤:人工养殖继代灰飞虱;2 个玉米品种的盆栽播种;2、3 龄灰飞虱若虫从 RBSDV 病株上饲毒,并将度过循环期的带毒灰飞虱接于 1~2 叶期的玉米幼苗上传毒;将获毒后的玉米幼苗移栽于大田中并生长至喇叭口期,具体参见任春梅等的方法^[6-7]。同期播种的玉米苗,保留足够数量不接毒的幼苗,肥、水等生长栽培管理同人工接毒苗。

1.2.2 miRNA 高通量测序 待郑单 958 玉米接毒株充分发病后,依照测序样品分类信息(表 1)进行样品采集,用液氮速冻、干冰保存等方式送至杭州联川生物技术股份有限公司进行 miRNA 的文库构建和高通量测序。

表 1 测序样品分类信息

编号	样品名称	英文缩写
1	郑单 958 未接毒叶片	nChL9
2	郑单 958 接毒叶片	CdL9
3	郑单 958 未接毒茎秆	nChS9
4	郑单 958 接毒茎秆	CdS9
5	农大 108 未接毒叶片	nChL1
6	农大 108 接毒叶片	ChL1
7	农大 108 未接毒茎秆	nChS1
8	农大 108 接毒茎秆	ChS1

1.2.3 miRNA 测序原始数据统计分析 测序获得原始序列(raw reads)后,首先去除 3' 端接头序列和垃圾序列,例如序列中有 80% A/C/G/T、3N(不一定是连续的)序列,获得净化的序列(clean reads);然后进行长度筛选,对于植物,保留碱基为 18~25 nt 的序列;接着将剩余的序列与 mRNA、RFam(含 rRNA、tRNA、snRNA 等)和 Repbase 数据库进行比对,并进行过滤,获得有效序列(valid reads),去除重复序列,获得单一原始序列和单一有效序列;对 miRNA 的长度分布情况进行统计。

1.2.4 miRNA 差异表达分析 统计测序结果中各样品 miRNA 的表达量,并进行 2 个品种相同组织在接种病毒、未接种病毒处理间的比对,筛选差异表达 miRNA 的标准为差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 、 $P < 0.05$ 。

1.2.5 差异表达 miRNA 靶基因的预测及富集分析 借助 Target Finder 对差异表达 miRNA 的靶基因进行预测,通过靶基因注释对玉米 miRNA 靶基因在生物学功能上行使的生物学作用进行分析。候选靶基因的注释借助于 Gene Ontology(简称 GO, <http://www.geneontology.org/>)和 Genome 中的

KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库。

2 结果与分析

2.1 miRNA 测序有效数据产出统计

待 8 个玉米 miRNA 文库通过高通量测序后,对每个文库内的全部小 RNA 片段进行测序,获得相应的原始序列数。然后进行长度筛选,过滤掉碱基长度小于 18 nt、大于 25 nt 的序列,去除重复的 miRNA 序列,分别获得有效序列、单一有效序列等,详见表 2。

表 2 miRNA 测序后的有效数据

样品编号	样品缩写名	原始序列数(个)	有效序列数(个)	单一有效序列数(个)
1	nChL9	12 154 015	3 593 030	801 515
2	CdL9	12 305 625	5 040 148	1 029 127
3	nChS9	13 307 188	7 324 511	2 451 884
4	CdS9	15 678 369	6 184 054	1 240 750
5	nChL1	14 809 367	6 103 828	1 262 452
6	ChL1	14 326 648	4 975 236	1 259 482
7	nChS1	13 386 448	11 119 951	5 048 594
8	ChS1	10 600 972	5 977 267	2 476 618

2.2 miRNA 的长度分布

在对测序的原始数据进行分析统计的基础上,对 8 个样品文库中过滤去重后的有效(valid)序列总数(total)以及种数(unique)进行长度分布统计,发现其丰度主要集中于 18~25 nt,且在 24 nt 处的序列丰度最大(图 1)。

2.3 差异 miRNA 的上下调统计分析

通过对抗、感粗缩病 2 个品种的相同组织在接种病毒、未接种病毒处理间进行比对,并用 TPM 算法进行归一化处理,获得几个样品比较组有上调、下调差异性表达的 miRNA 情况。从图 2 可以看出,抗病品种农大 108 接毒后,健康植株茎秆、叶片材料较接毒前健康植株的比较组(ChL1 vs nChL1, ChL1 vs nChL1)的差异 miRNA 下调数明显较上调数多,而感病品种郑单 958 接毒后病株 miRNA 较接毒前健康植株(CdL9 vs nChL9, CdS9 vs nChS9)的比较组则相反,其差异 miRNA 的上调数较下调数多,尤其在叶片材料中,这可能是玉米抗病品种抗病机制的一种表现。

2.4 差异表达 miRNA 的筛选

通过对 8 个文库中的 miRNA 进行归一化分析,确认相关 miRNA 的表达差异。由表 3 可以看出, zma - miR156a - 5p、zma - miR1432 - 5p、zma - miR390a - 5p、zma - miR156k - 5p、zma - miR396f -

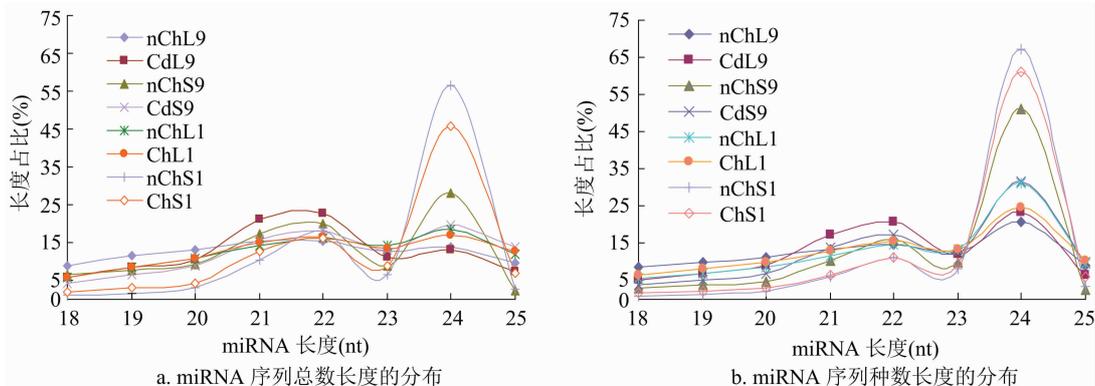


图1 8 个样品文库 miRNA 序列的长度分布

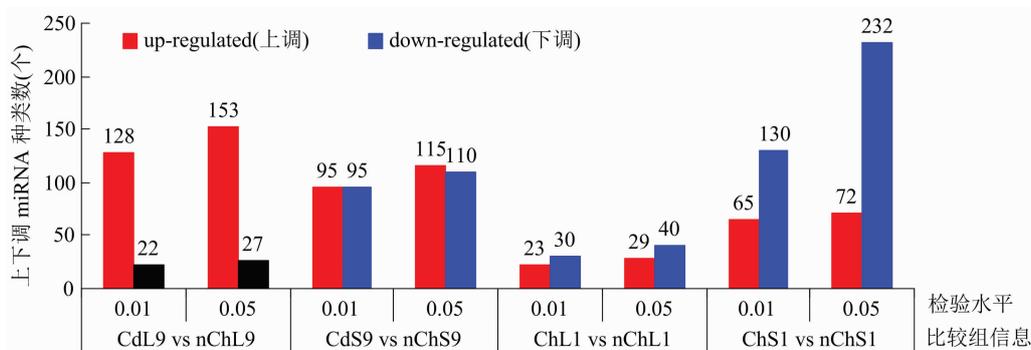


图2 玉米抗、感病品种不同比较组中差异 miRNA 的上、下调情况

3p, zma - miR166a - 3p, zma - miR164f - 5p, zma - miR167e - 5p, zma - miR394a - 5p 等 9 个 miRNA 在感病品种郑单 958 和抗病品种农大 108 的叶片、茎秆组织中接毒前后表达趋势相反,因此选择这 9 个 miRNA 作为重要 miRNA 展开研究。

2.5 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 分析

对筛选出的 9 个差异 miRNA 的靶基因与

Genome、Gene Ontology 等生物信息数据库中的数据 进行比对,进行 GO 富集性分析,发现差异 miRNA 的部分靶基因及其作用位点的生物学功能与玉米粗缩病抗性密切相关。其中,zma - miR156a - 5p 的部分靶基因与寄主对病原物的防御性反应相关,zma - miR1432 - 5p 的部分靶基因与病毒的加工、装配有关,zma - miR390a - 5p 的部分靶基因与病毒粒

表 3 RBSDV 侵染前后不同抗感性玉米材料相关 miRNA 的表达差异

miRNA 名称	郑单 958(感病品种)		农大 108(抗病品种)	
	叶片	茎秆	叶片	茎秆
	CdL9 vs nChL9	CdS9 vs nChS9	ChL1 vs nChL1	ChS1 vs nChS1
zma - miR156a - 5p	up	up	down	down
zma - miR1432 - 5p	up	up	down	down
zma - miR390a - 5p	down	down	up	up
zma - miR156k - 5p	up	up	down	down
zma - miR396f - 3p	up	up	down	down
zma - miR166a - 3p	up	up	down	down
zma - miR164f - 5p	down	down	up	up
zma - miR167e - 5p	up	up	down	down
zma - miR394a - 5p	down	down	up	up

注:CdL9 vs nChL9 表示郑单 958 接毒后病叶比对其接毒前健叶;CdS9 vs nChS9 表示郑单 958 接毒后病茎比对其接毒前健茎;ChL1 vs nChL1 表示农大 108 接毒后健叶比对其接毒前健叶;ChS1 vs nChS1 表示农大 108 接毒后健茎比对其接毒前健茎。

子在寄主内细胞间的传输有关,其他 miRNA 的靶基 性反应等(表 4)。
因也多参与寄主的细胞信号传导、免疫应答的防卫

表 4 靶基因 GO 富集性分析涉玉米粗缩病抗性相关的重要 miRNA

miRNA 名称	靶基因 GO ID(Gene Ontology 登录号或编号)	功能
zma - miR156a - 5p	GO: 0004842; GO: 0010928; GO: 0009736; GO:0009817;GO:0045087;GO:0045814	泛素蛋白转移酶活性;生长素介导的信号通路的调控;细胞分裂素活性信号通路;对病原物的防御性反应;固有性免疫应答反应;基因表达的负向调控,表观遗传
zma - miR1432 - 5p	GO: 0016032; GO: 0009873; GO: 0009723; GO: 0000139; GO: 0009737; GO: 0009867; GO:0009816	病毒加工、装配;乙烯活性信号通路;对乙烯代谢的应答;参与高尔基体的功能;对脱落酸代谢的应答;茉莉酸介导的信号通路;对细菌等的防卫性反应
zma - miR390a - 5p	GO: 0046740; GO: 0042742; GO: 0007169; GO:0006898;GO:0009828; GO:0052544	寄主中细胞间病毒粒子的传输;对细菌等的防御性反应;跨膜蛋白酪氨酸激酶信号通路;受体介导的内吞胞植物型细胞壁的松动;通过细胞壁胼胝质沉积的防御反应
zma - miR156k - 5p	GO: 0009734; GO: 0010928; GO: 0009867; GO: 0009506; GO: 0006397; GO: 0000976; GO:0010228;GO:0007169;GO:0045814	生长素活性信号通路;生长素介导的信号通路的调控;茉莉酸介导的信号通路;构成胞间连丝;mRNA 加工;转录调控区序列特异性 DNA 结合;分生组织由营养生长向生殖生长的转变;跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路;基因表达的负向调控,表观遗传
zma - miR396f - 3p	GO:0045815;GO:0009932;GO:0048768	基因表达的正向调控,表观遗传;茎尖生长;根毛细胞尖端生长
zma - miR166a - 3p	GO:0004842;GO:0016567;	泛素连接酶转移活性;蛋白质泛素化
zma - miR164f - 5p	GO:0004842;GO:0009737;GO:0009873	泛素连接酶转移活性;对脱落酸的应答反应;乙烯活性信号通路
zma - miR167e - 5p	GO: 0040029; GO: 0010216; GO: 0006952; GO:0031048;GO:0006417	基因表达的调控,表观遗传;维持 DNA 甲基化;防御性反应;小 RNA 沉默染色质;翻译的调节
zma - miR394a - 5p	GO: 0004842; GO: 0010928; GO: 0019005; GO:0031146	泛素蛋白转移酶活性;生长素介导的信号通路的调控;SCF (Skp1 - Culins - F - box) 泛素连接酶复合物;SCF 依赖的蛋白酶体分解过程

2.6 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 分析

对筛选出的差异表达 miRNA 靶基因进行 KEGG 富集性分析发现,部分通路可能与玉米种质抗病(粗缩病)性相关。其中多个 miRNA 涉及的 ko04626 - 植物病毒与植物寄主与病原间的相互作用

用、ko00130 - 泛醌及其他萜类醌的生物合成、ko04075 - 植物激素信号传导、ko00280 - 泛素介导的蛋白水解作用相关(表 5)。对 ko04626 通路分析发现,靶基因通过调控 *RARI*、*SGT1*、*HSP90* 等关键基因参与玉米与病原物的互作(图 3)。

表 5 靶基因 KEGG 通路分析涉粗缩病抗性相关的 KEGG 通路 ID 及所属 miRNA

miRNA	靶基因 KEGG 通路 ID	功能
zma - miR156a - 5p	ko04075;ko04626;ko03040;ko03015	植物激素信号传导;植物寄主与病原间的相互作用;剪切体;mRNA 监测通路
zma - miR156k - 5p	ko04075; ko04626;	植物激素信号传导;植物寄主与病原间的相互作用
zma - miR1432 - 5p	ko04626;ko00270	植物寄主与病原间的相互作用;半胱氨酸和蛋氨酸代谢
zma - miR390a - 5p	ko04075;ko00130;ko04626;	植物激素信号传导;泛醌及其他萜类醌的生物合成;植物寄主与病原间的相互作用
zma - miR396a - 5p	ko00310;ko00130;ko04626;ko00908; ko04120	赖氨酸降解,与组氨酸、赖氨酸甲基转移酶相关;泛醌及其他萜类醌的生物合成;植物寄主与病原间的相互作用;玉米素生物合成;泛素介导的蛋白水解作用
zma - miR166a - 3p	ko04120; ko04141	泛素介导的蛋白水解作用;内质网中的蛋白质加工

3 结论与讨论

当前对于玉米粗缩病的研究多聚焦于致病机制方面,对于其抗病机制的研究相对较少。水稻黑条矮缩病病毒通过细胞外壁的伤口或昆虫介体刺吸而造成微伤侵染玉米后,会引起寄主防御系统中

相关基因表达、蛋白质合成、激素水平及生物途径的变化,使玉米生长受阻、发育不良,最终导致发病甚至死亡^[8-10]。在此期间,玉米抗、耐病品种被植物病毒侵染诱导寄主产生大量的 miRNA 中,相关 miRNA 即可通过上调或者下调等模式,抑制防卫反应中的负调控因子或促进防卫反应中的正向调控因

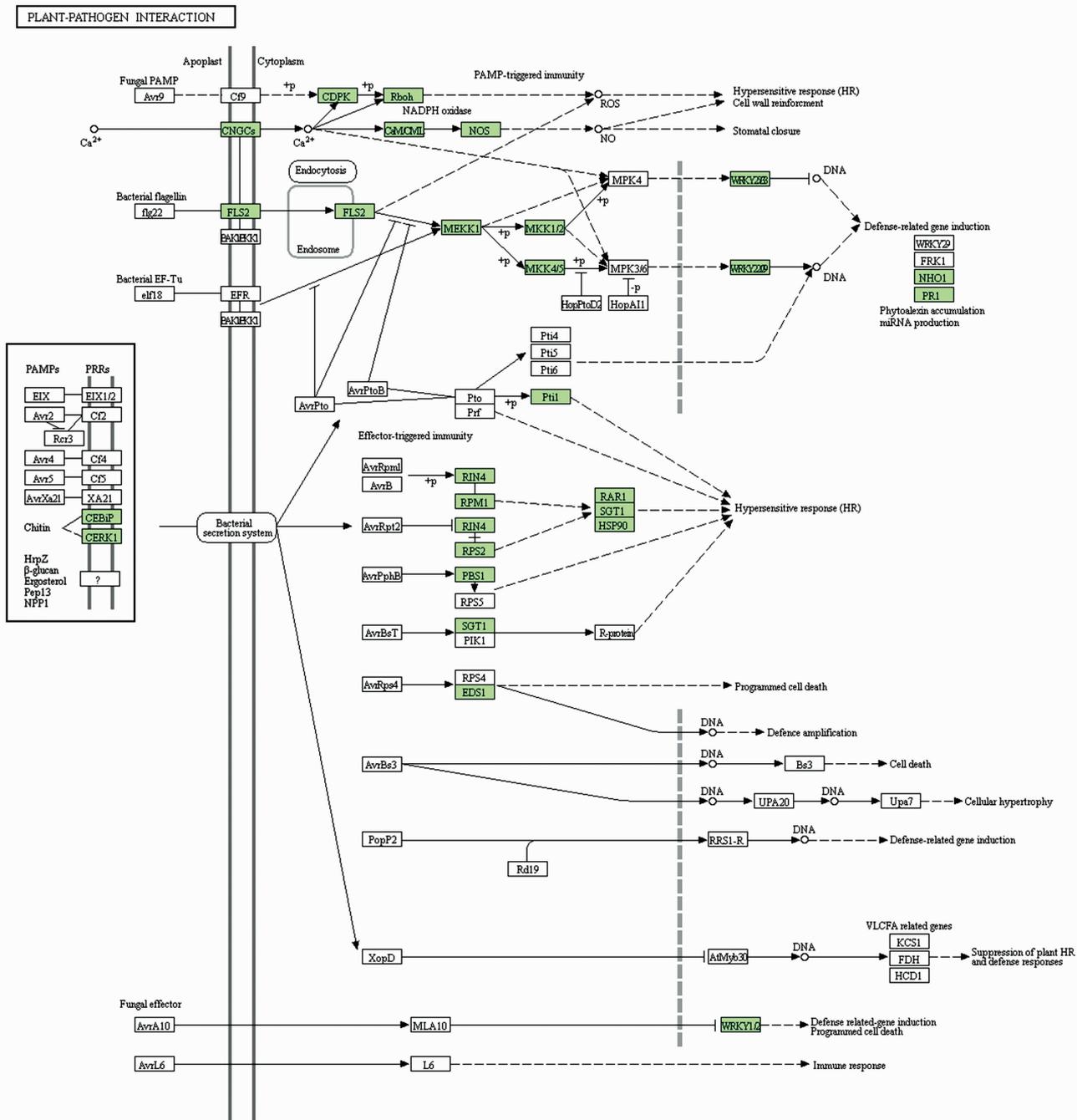


图3 靶基因 KEGG 分析 ko04626(植物与病原相互作用)代谢通路

子,进而行使功能,可能是玉米抗耐病机制的一种表现^[11]。本研究中涉及的 zma - miR156、zma - miR1432、zma - miR390a - 5p、zma - miR164f - 5p 等多个 miRNA,均在受到 RBSDV 侵染胁迫后,在玉米抗、感病种质材料中呈现相反的表达趋势,且存在 2 种情况,部分在抗性材料(农大 108)中表现为上调,在感病材料(郑单 958)中表现为下调,另一种情况恰好相反,分析其原因,可能是 miRNA 的靶基因在抗病防御性反应中的正、负调控机制差异所致。

此外,在本研究中,抗耐病品种农大 108 接毒后,与接毒前相比,健康植株茎秆、叶片中差异 miRNA 下调数明显较上调数多,与感病品种郑单 958 在接毒后病株与接毒前健康植株比较的情况相反,可能是玉米抗、感品种分别受到粗缩病侵染胁迫时内源 miRNA 自身反馈调节的一种真实体现。农大 108 受到粗缩病病原侵染后,差异 miRNA 下调数多于上调数,可能由于 miRNA 所起作用的靶基因负调控作用机制相对较多,从而抑制了抗耐病品种

植株发病,而感病品种郑单 958 受到病毒侵染后,差异 miRNA 的上调数多于下调数,植物病毒在与寄主的互作中占据优势,导致寄主发病。

另有研究者分别对水稻与玉米 miRNA 及其靶基因对玉米粗缩病病毒的应答通路进行了研究^[12-14],结果显示,一些 miRNA 家族及其靶基因在玉米与病毒互作中起着重要作用^[14]。例如,与泛素有关(miR166a-3p 等)的靶基因的表达受抑制,泛素合成途径相关基因的表达发生变化,表明泛素途径在玉米抗粗缩病中起着重要作用。黄强的研究表明,RBSDV 的侵染引起玉米中吲哚-3-乙酸(IAA)含量下降,玉米素核苷(ZR)相对保持不变,细胞分裂素与生长素的比值(C/A)升高,引起玉米顶端优势丧失,并导致细胞分化的紊乱,出现植株矮缩、脉突、心叶无法抽出等生长畸形症状,粗缩病症状迅速表现,导致植株畸形生长^[9]。

此外,1 种 miRNA(例如 miR156)可同时参与玉米的生长发育、信号传导、转录调控等多种功能,并在粗缩病胁迫响应过程发挥重要作用^[15-16]。分析其原因可能是玉米粗缩病诱导玉米体内 miRNA 调控其靶基因参与信号传导、抗氧化胁迫、自身反馈调节、抗病相关代谢等途径^[17-18],各类抗病途径共同构建了玉米抗粗缩病胁迫的复杂的防御机制。

参考文献:

- [1] 孙晓民,韩成卫,曾苏明,等. 玉米粗缩病发生规律与防控对策[J]. 吉林农业科学,2010,35(5):31-33.
- [2] 陈佳,朱芹芹,袁从阳,等. 引起玉米粗缩病的水稻黑条矮缩病病毒山东分离物的分子特性[J]. 植物病理学报,2008,38(5):540-543.
- [3] 王升吉,张恒木,赵玖华,等. 山东玉米粗缩病原 S10 序列分析[J]. 玉米科学,2013,21(6):26-30.
- [4] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science,2003,301(5631):336-338.
- [5] Wu J G, Yang Z R, Wang Y, et al. Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA[J]. Elife,2015,4:e05733.
- [6] 任春梅,杨柳,刘保申,等. 一种高通量玉米粗缩病人工接种鉴定方法的建立及应用[J]. 玉米科学,2018,26(2):142-148.
- [7] 施艳,韩晓玉,刘焱昆,等. 河南省玉米粗缩病抗病品种鉴定及病害与产量的相关性分析[J]. 河南科学,2020,38(2):208-211.
- [8] Liu H J, Wei C H, Zhong Y W, et al. Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts[J]. FEBS Letters, 2007, 581(13):2534-2540.
- [9] 黄强. 玉米粗缩病症与内源激素水平变化的关系研究[D]. 成都:四川农业大学,2010.
- [10] 杨青,郝俊杰,王新涛,等. 玉米粗缩病抗病基因定位和抗病育种研究进展[J]. 分子植物育种,2020,18(12):4021-4028.
- [11] Peng D, Wu J G, Zhang J Y, et al. Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors[J]. PLoS Pathogens,2011,7(8):e1002176.
- [12] Xu D L, Mou G P, Wang K, et al. MicroRNAs responding to southern rice black streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom development in rice[J]. Virus Research,2014,190(9):60-68.
- [13] 李荣改,陆艳梅,王月影,等. 玉米粗缩病的分子研究新进展[J]. 植物学报,2017,52(3):375-387.
- [14] Zhou Y, Xu Z N, Duan C X, et al. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to rice black-streaked dwarf virus in maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(15):4593-4609.
- [15] 雷凯键,刘浩. 植物调控枢纽 miR156 及其靶基因 SPL 家族研究进展[J]. 生命的化学,2016,36(1):13-20.
- [16] Wang J W, Czech B, Weigel D. MiR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. Cell,2009,138(4):738-749.
- [17] 朱早兵,虞夏清,翟于菲,等. 黄瓜 microRNA171 的克隆与功能分析[J]. 园艺学报,2019,46(5):864-876.
- [18] Li Z X, Li S G, Zhang L F, et al. Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2016,127(2):461-473.