

中图分类号: S532; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2023)04-0289-17

遗传育种

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2023.04.001

马铃薯干旱相关 microRNA 的鉴定及其表达分析

刘溶荣^{1,2}, 陈炜曦^{1,2}, 尹济容², 李姿燕^{1,2}, 王季春^{1,2,3,4}, 荐红举^{1,2,3,4*}, 吕典秋^{1,2,3,4*}

(1. 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 西南大学, 重庆 400715; 2. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715;

3. 西南大学南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715; 4. 西南大学薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 马铃薯是世界第三大粮食作物, 随着气候变暖以及淡水资源短缺, 干旱成为制约其生长发育的重要因素。为了明确马铃薯响应干旱胁迫相关的 microRNA(miRNA)及其靶基因的调控模式, 利用 small RNA 测序技术、生物信息学方法和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术, 对 20% PEG6000 模拟干旱处理 0, 1, 3, 6, 12, 24 和 48 h 共 7 个时间点马铃薯组培幼苗的 sRNA 进行高通量测序、筛选和鉴定。从 7 个处理 2 个生物学重复共计 14 个样本中鉴定到 621 个 miRNAs, 包括 308 个已知 miRNAs 和 313 个新预测的 miRNAs。其中 250 个已知 miRNAs 属于 69 个家族, 166 个新的 miRNAs 属于 59 个家族。miRNA 长度分布在 20~24 nt, 其中主要集中在 21 和 24 nt。差异表达分析共鉴定到 40 个差异表达的 miRNAs, 包括 16 个已知 miRNAs 和 24 个新的 miRNAs。联合靶基因预测结果和干旱转录组数据, 分别对 16 个已知和 17 个新 miRNAs 的 81 个和 70 个靶基因进行了功能注释, 其主要参与生长代谢、胁迫响应、氧化还原反应及生物合成等过程; qRT-PCR 分析结果与测序结果基本一致。研究为进一步挖掘马铃薯响应干旱胁迫的 miRNA, 以及阐明马铃薯中 miRNA 参与干旱响应的分子机制提供理论依据。

关键词: 马铃薯; 干旱胁迫; small RNA 测序; microRNA; 靶基因; qRT-PCR

Identification and Expression Analysis of microRNA Associated with Drought Stress in Potato

LIU Rongrong^{1,2}, CHEN Weixi^{1,2}, YIN Jirong², LI Ziyang^{1,2}, WANG Jichun^{1,2,3,4}, JIAN Hongju^{1,2,3,4*}, LU Dianqiu^{1,2,3,4*}

(1. Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. Chongqing Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding for Tuber and Root Crops, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Potato is the third largest food crop in the world, and with climate change and freshwater scarcity, drought becomes a major factor restricting its growth and development. In order to clarify the regulatory patterns of microRNA (miRNA) and their target genes response to drought stress in potato, small RNA sequencing technology, bioinformatics analysis, and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) technology were used to screen and identify the sRNA of potato *in vitro* plantlets at the seven time points of 0, 1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours under simulated drought treatment

收稿日期: 2023-08-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE0127900); 重庆市现代农业产业技术体系(CQMAITS202303); 国家自然科学基金(32101659); 西南大学人才引进项目(SWU019008); 中央高校基本科研业务费专项资金(SWU-KT22036)。

作者简介: 刘溶荣(1998-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为马铃薯遗传育种。

*通信作者(Corresponding author): 荐红举, 博士, 副教授, 主要从事马铃薯抗逆分子生物学研究, E-mail: hjjian518@swu.edu.cn; 吕典秋, 博士, 教授, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: smallpotatoes@126.com。

with 20% PEG6000. A total of 621 miRNAs were identified from 14 samples with seven treatments and two biological replicates, including 308 known-miRNAs and 313 newly predicted miRNAs. Among them, 250 known-miRNAs belonging to 69 different families were detected, and 166 novel-miRNAs belonging to 59 different families. The length of miRNA is mainly distributed between 20-24 nt, with most of them concentrated in 21 and 24 nt. A total of 40 differentially expressed miRNAs were identified, including 16 known-miRNAs and 24 novel-miRNAs. Combining target gene prediction results and drought treatment transcriptome data, 81 and 70 target genes of 16 known and 17 novel miRNAs were functionally annotated, which are mainly involved in growth metabolism, stress response, redox and biosynthesis processes; and qRT-PCR results indicated that the sequencing results are accurate and reliable. This study provides a theoretical basis for further exploring the miRNA in potato response to drought stress and elucidating the molecular mechanisms by which miRNA participate in drought response.

Key Words: potato; drought stress; small RNA sequencing; microRNA; target gene; qRT-PCR

近年来, 极端天气频发, 干旱作为全球变暖带来的十大危害之一, 严重影响了农业生产^[1]。马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)作为浅根系作物, 对水分十分敏感, 干旱在马铃薯各个生育时期都有可能发生, 且在各时期对马铃薯不同品种会造成不同程度的影响, 最终影响其产量和品质^[2-4]。

miRNA是一类长度为18~25 nt的内源性非编码单链小分子RNA, 越来越多的证据表明, miRNA参与调控植物对非生物胁迫的响应^[5]。干旱胁迫上调了拟南芥中 miR156、miR159、miR167、miR168、miR171、miR172、miR319、miR393、miR394a、miR395c、miR395e、miR396和miR397的表达水平, 降低了miR161、miR168a、miR168b、miR169、miR171a和miR319c的表达水平^[6,7]。但在某些情况下, miRNA对干旱胁迫的响应取决于物种。例如, 干旱胁迫下miR156表达丰度在水稻^[8]和玉米^[9]中下调, 而在拟南芥^[6]、大麦^[10]和野生二粒小麦^[11]中上调。在拟南芥中, miR319-*TCP4*通过介导茉莉酸和生长素的合成途径参与干旱胁迫^[12]。在抗旱能力不同的烟草品种中, miR398在干旱胁迫后呈现出不同的表达模式, 但是均可抑制其靶标铜锌超氧化物歧化酶基因(*Cu/Zn-SOD*, *CSD*)的表达^[13]。Yang等^[14]预测了干旱胁迫下马铃薯中脯氨酸积累相关的miRNAs, 发现miR172、miR396a、miR396c和miR4233调控吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(*P5CS*), miR2673和miR6461分别调控吡咯啉-5-羧酸还原酶基因(*P5CR*)和脯氨酸脱氢酶基因

(*ProDH*); Zhang等^[15]通过深度测序对马铃薯干旱胁迫下保守和新型的miRNAs进行了鉴定, 确定了4个调控干旱相关基因(miR811、miR814、miR835、miR4398)。鉴定到3个stu-miR159成员(stu-miR159a、stu-miR159b和stu-miR159c)均在马铃薯干旱胁迫处理25 d后表达量显著降低, 预测的3个靶基因GAMyb-like家族成员(*StGAMyb1*、*StGAMyb-like2.1*和*StGAMyb-like2.2*)表达量显著增加^[16]。因此, 关于响应马铃薯干旱相关的miRNA及其靶基因还有待深入挖掘。

本研究旨在通过20% PEG6000模拟干旱处理, 对0, 1, 3, 6, 12, 24和48 h共7个时间点的马铃薯组培苗进行sRNA文库构建和测序, 利用生物信息学分析的方法, 鉴定响应干旱胁迫的miRNA及其靶基因, 探究miRNA及其靶基因在马铃薯干旱胁迫下的调控作用, 为后期miRNA的功能验证奠定基础, 同时为阐明马铃薯参与干旱响应的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以马铃薯品种‘克新18号’组培苗为试验材料, 供试材料为重庆市薯类生物学与遗传育种重点实验室保存。

1.2 试验方法

在Murashige & Skoog (MS)培养基(3%蔗糖)进行组培苗的生长, 14 d后移出, 炼苗2 d后使用1/2

Hoagland 营养液水培 5 d (16 h 光照/8 h 黑暗; 22℃/18℃)。

使用 20% PEG6000 替换营养液, 在 0, 1, 3, 6, 12, 24 和 48 h 分别取相同部位叶片, 各处理 2 次生物学重复, 每个生物学重复使用 3 株叶片混合, 液氮速冻后于 -80℃ 保存。

1.3 sRNA 文库的构建与测序

将上述 14 个样本送至百迈客生物科技有限公司, 提取 RNA, 质检合格后, 使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行 sRNA 文库构建和测序。对获得的原始测序数据进行质量控制, 去除未知碱基 N (N 为无法识别的碱基) 含量大于等于 10% 的和没有 3' 接头序列的 Reads, 剪切掉 3' 接头序列, 获得 18~30 个核苷酸的高质量值序列 (即 Clean reads)。

1.4 sRNA 测序数据分析

利用 Bowtie 软件, 将 Clean reads 分别与 Silva 数据库、GtRNAdb 数据库、Rfam 数据库和 Repbase 数据库进行序列比对, 过滤核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等非编码 RNA (ncRNA) 以及重复序列, 获得包含 miRNA 的 Unannotated reads。利用 Bowtie 软件将 Unannotated reads 与马铃薯杂合二倍体参考基因组 (RH89_039_16_v2) 进行序列比对, 获取在参考基因组上的位置信息 (即 Mapped reads)。

将 Mapped reads 与 miRBase (v22) 数据库中已知 miRNA 的成熟序列及其上游 2 nt 与下游 5 nt 的范围进行比对, 最多允许一个错配, 鉴定到已知 miRNA (Known-miRNAs); 利用 miRDeep2 软件包, 通过 Reads 比对到基因组上的位置信息得到可能的前体序列, 基于 Reads 在前体序列上的分布信息 (基于 miRNA 产生特点、Mature、Star、Loop) 及前体结构能量信息 (RNAfold randfold), 采用贝叶斯模型经打分最终实现新 miRNA (Novel-miRNAs) 的预测。基于序列的相似性使用 miRDeep2 软件对检测到的已知 miRNA 和新 miRNA 进行 miRNA 家族分析。

1.5 干旱胁迫下 miRNA 的差异表达分析

对各样本中 miRNA 进行表达量的统计, 并用 TPM 算法对表达量进行归一化处理。TPM 归一化

处理公式为:

$$\text{TPM} = \text{Read count} \times 1\,000\,000 / \text{Mapped reads}$$

式中: Read count 表示比对到某一 miRNA 的 Reads 数目。

使用皮尔森相关系数对样品间相关性进行计算, 计算公式为:

$$P(X, Y) = \text{cov}(X, Y) / \sigma_X \sigma_Y$$

使用 $|\log_2(\text{FC})| \geq 0.58$; $P\text{-value} \leq 0.05$ 作为筛选标准, 采用 Benjamini-Hochberg 校正方法对原有假设检验得到的显著性 P 值 (P value) 进行校正, 使用 DESeq2 进行样品组间的差异表达分析, 获得差异表达 miRNA 集。

1.6 miRNA 靶基因预测及差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 通路富集

根据 Known-miRNAs 和 Novel-miRNAs 与 RH89_039_16_v2 的基因序列信息, 使用 TargetFinder 软件进行靶基因预测。使用 BLAST 软件将预测靶基因序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KEGG、KOG 和 Pfam 数据库比对, 获得靶基因的注释信息。

利用富集因子 (Enrichment factor) 分析差异表达 miRNA 靶基因在某一通路上的富集程度, 并利用 Fisher 精确检验方法计算 P 值, 经 FDR 矫正 P 值后得到 Q 值 (Q value)。其中富集因子的计算公式为:

富集因子 = (单个 Pathway 中的差异表达 miRNA 靶基因数 / 单个 Pathway 中的所有靶基因数) / (所有 Pathway 中的差异表达 miRNA 靶基因数 / 所有 Pathway 中的所有靶基因数)

选取富集显著性最可靠 (即 Q value 最小) 的前 20 个通路进行结果展示, 得到差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集结果, 利用联川生物云平台 (<https://www.omicstudio.cn/home>) 进行作图展示。

1.7 总 RNA、miRNA 提取及 cDNA 第一条链合成与逆转录

使用 EASY spin 植物 microRNA 快速提取试剂盒 (艾德莱, 中国) 对 20% PEG6000 处理 0, 3, 12 和 48 h 的叶片提取包含 miRNA 的总 RNA; 使用该公司的增强型 miRNA 反转录试剂盒进行 miRNA 3' 末端的 PolyA 加尾和逆转录反应。

1.8 引物设计及 qPCR 验证

参照加 PloyA 尾法^[17], 对筛选出的差异表达 miRNA 设计正向荧光定量 PCR 引物, 以马铃薯 18S rRNA 为内参基因。miRNA 上游引物见表 1, 下游为北京艾德莱生物科技公司荧光定量检测试剂盒中提供的通用引物。反应体系及反应程序参照试剂盒说明书。

每个 miRNA 选择两个靶基因, 通过 Spud DB

(<http://spuddb.uga.edu/>) 获得靶基因的 CDS 序列, 使用 Beacon Designer 7.9 软件进行定量引物设计 (表 2), 以马铃薯 *EF1α* 作为内参基因。每个样品设 3 次生物学重复、3 次技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法计算基因的相对表达量。

1.9 数据处理与作图

利用 Excel Microsoft 365 软件进行数据整理分析, 使用 GraphPad Prism 9 软件进行作图展示。

表 1 miRNA 荧光定量 PCR 上游引物序列
Table 1 Forward primer sequences for miRNA qPCR

miRNA 名称 miRNA name	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	miRNA 名称 miRNA name	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')
stu-miR482a-5p	GGAATTGGTGGATTGGAAGC	novel_miR_283	TGCTTTTTCGGTATCCTCTCC
stu-miR393-3p	ATCATGCGATCTCTTCGGAAT	novel_miR_159	CGATGAACCTGGTTCTGATACC
stu-miR391-3p	CCGCATCATACTCTGCATATT	novel_miR_110	CGCTGGGTTTGAGAAGTAATAATTT
18S rRNA	TTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA		

表 2 靶基因荧光定量 PCR 引物
Table 2 qPCR primers of target genes

miRNA 名称 miRNA name	靶基因编号 Target gene ID	基因名 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
stu-miR482a-5p	Soltu.DM.02G010790.1	<i>StCLC-B</i>	TATGGCTGTTCAATGAGA	TTGGCAGAAGGAGAAGATT
	Soltu.DM.08G017480.2	<i>StAST</i>	TCCTATTCTCGGCGTTAC	TTCCTTCCTCTGTCTATATG
stu-miR393-3p	Soltu.DM.10G025000.1	<i>StCHP1</i>	AAGCAGCAGAACACCTAA	TGATGTTACTCCGACTGAAT
	Soltu.DM.10G025590.1	<i>StCHP2</i>	CCTATGCTCATCAGAATGTG	GCCTCGGAATCAGTTACT
stu-miR391-3p	Soltu.DM.05G019830.1	<i>StELGP</i>	GTCCAAC TTCACGAATCAG	TTAGACTGCTTCCTCTTCTC
	Soltu.DM.01G048750.1	<i>StGBF</i>	CTACTTCTTGCTGTTGTG	GTTCTGATGCTCTTCTTCTG
novel_miR_159	Soltu.DM.04G029750.1	<i>StPrp4</i>	AGTTCCAACAGACATCAATG	TTCAGAGTTCTTCTACCTAC
	Soltu.DM.10G007120.1	<i>StpsbY</i>	GCGACACTTGATGGTATG	TGAAGAGGTCCGTAAGAAG
novel_miR_283	Soltu.DM.08G007450.1	<i>StALPL</i>	CAGTTCTCGTGCCTTCTA	GTTCATAGGTAGCAGCATATC
	Soltu.DM.05G002880.2	<i>StCYP</i>	ACCATCGCCATCATAGTAA	CCTCCGTTCTCAATCTCA
novel_miR_110	Soltu.DM.02G028540.1	<i>StACL5</i>	GCACTTCCTGTTCTTGAC	TACTCCACCAACCTTAACC
	Soltu.DM.09G006870.1	<i>StPP2C</i>	TCCTTCTCCAAGCCGATCCTCAG	GCCTCCTGTTGCTAAGATGTTCC

2 结果与分析

2.1 sRNA 文库数据初步分析

对 14 个样品的 sRNA 测序原始数据进行质控, 从各样品中获得了高质量值序列 (表 3)。14 个样品中功能未注释的序列数在 12 628 838 (63.86%) ~

16 227 826 个 (77.15%), rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等 ncRNA 以及重复序列占比较少。一般在植物中 rRNA 低于 60% 被认为是合格品, 本测序结果的 14 个样本中 rRNA 数目在 4 314 282 (20.51%) ~ 6 763 846 个 (34.20%), 说明 sRNA 文库的构建是合格的, 可以进行下一步分析。

表 3 小RNA的种类和数量
Table 3 Categorization of unique reads and total reads of small RNA

样本名 Sample name	小RNA类型 sRNA type	rRNA	scRNA	snRNA	snoRNA	tRNA	重复序列 Repbse	未注释 Unannotated	高质量 Clean reads
CKS1	数目(个)	4 403 104	0	5	7 251	233 143	143 886	11 780 590	16 567 979
	百分比(%)	26.58	0	0	0.04	1.41	0.87	71.10	100
CKS2	数目(个)	5 649 639	0	1	12 556	286 241	201 296	15 030 630	21 180 363
	百分比(%)	26.67	0	0	0.06	1.35	0.95	70.97	100
D1S1	数目(个)	5 227 421	0	0	9 658	188 041	209 709	15 749 092	21 383 921
	百分比(%)	24.45	0	0	0.05	0.88	0.98	73.64	100
D1S2	数目(个)	6 763 846	0	3	12 320	206 967	164 243	12 628 838	19 776 217
	百分比(%)	34.20	0	0	0.06	1.05	0.83	63.86	100
D3S1	数目(个)	4 181 102	0	0	10 109	208 572	187 841	13 593 925	18 181 549
	百分比(%)	23.00	0	0	0.06	1.15	1.03	74.76	100
D3S2	数目(个)	4 314 282	0	0	9 922	275 387	206 751	16 227 826	21 034 168
	百分比(%)	20.51	0	0	0.05	1.31	0.98	77.15	100
D6S1	数目(个)	4 664 516	0	0	7 339	141 067	163 557	12 698 896	17 675 375
	百分比(%)	26.39	0	0	0.04	0.80	0.93	71.84	100
D6S2	数目(个)	5 775 622	0	2	10 903	216 866	266 567	20 401 262	26 671 222
	百分比(%)	21.65	0	0	0.04	0.81	1.00	76.50	100
D12S1	数目(个)	3 951 126	0	0	8 492	164 793	146 149	11 250 821	15 521 381
	百分比(%)	25.46	0	0	0.05	1.06	0.94	72.49	100
D12S2	数目(个)	3 161 874	0	0	7 035	117 676	133 457	9 959 362	13 379 404
	百分比(%)	23.63	0	0	0.05	0.88	1.00	74.44	100
D24S1	数目(个)	4 259 932	0	7	9 918	340 017	180 929	13 507 619	18 298 422
	百分比(%)	23.28	0	0	0.05	1.86	0.99	73.82	100
D24S2	数目(个)	4 460 592	0	0	7 607	143 371	176 299	13 020 489	17 808 358
	百分比(%)	25.05	0	0	0.04	0.81	0.99	73.11	100
D48S1	数目(个)	4 808 160	0	1	10 591	180 806	193 662	14 205 255	19 398 475
	百分比(%)	24.79	0	0	0.05	0.93	1.00	73.23	100
D48S2	数目(个)	3 954 720	0	0	9 390	240 729	195 276	14 135 734	18 535 849
	百分比(%)	21.34	0	0	0.05	1.30	1.05	76.26	100

将未注释的序列与马铃薯杂合二倍体参考基因组(*Solanum tuberosum* RH89_039_16_v2)进行序列比对, 获取在参考基因组上的位置信息(表4)。各样本比对到参考基因组上的Reads数在6 651 941 (56.47%)~8 612 998个(60.93%), 比对到正链上的Reads数占有Unannotated reads的比例在39.54%~42.48%, 比对到负链上的Reads数占比在16.93%~18.53%。总体来看, 14个样本中一半以上的未注释序列可以比对到参考基因组上, 且大多数序列比对到基因组正链上。

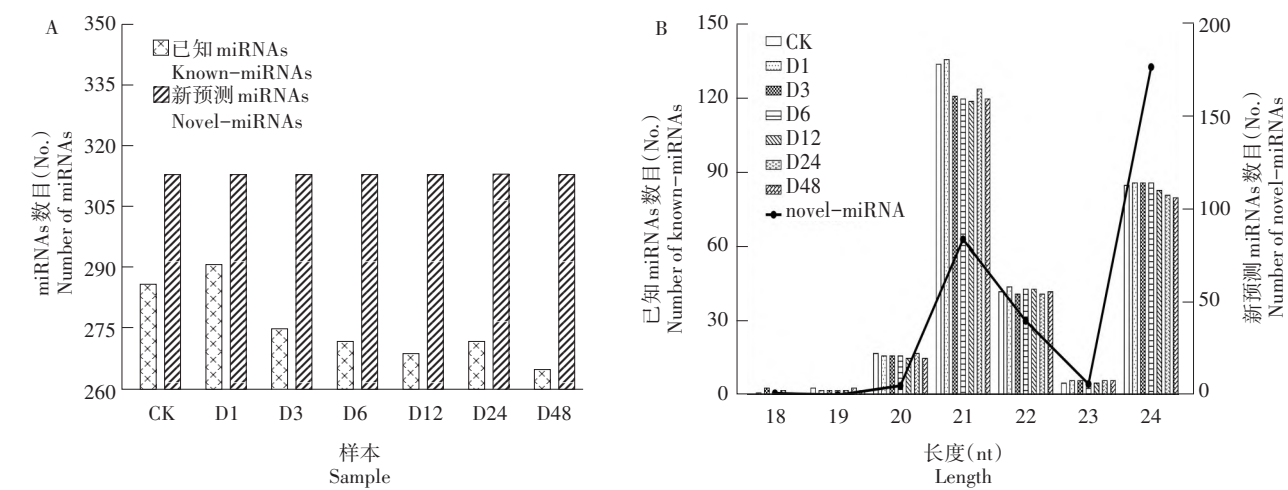
2.2 马铃薯中已知和新miRNA鉴定及序列长度分布

14个样品共得到621个miRNAs, 其中已知miRNAs(Known-miRNAs)308个, 新预测miRNAs(Novel-miRNAs)313个。CK、D1、D3、D6、D12、D24和D48样品中分别发现了286、291、275、272、269、272和265个Known-miRNAs, CK和D1中Known-miRNAs的数量明显多于其他处理, 随着处理时间的延长, Known-miRNAs的数量逐渐减少; 各处理中发现的Novel-miRNAs数量相同, 均为313个(图1A)。不同大小的miRNAs在各

处理中分布相似, 大都在 20~24 nt 分布。且 Known-miRNAs 和 Novel-miRNAs 的长度都集中在 21 和 24 nt, 但 Known-miRNAs 在长度为 21 nt 的序列含量最高, 其次为 24 nt 的序列, 并且干旱胁迫处理 3 h 后, 21 nt 的 Known-miRNAs 数目明显减少; Novel-miRNAs 则相反, 在长度为 24 nt 的序列含量最高, 其次为 21 nt; 在 22 和 23 nt 的 Known-miRNAs 和 Novel-miRNAs 的序列数目相似(图 1B)。

表 4 参考基因组比对信息
Table 4 Distribution of sequence reads mapped to genome

样本名 Sample name	原始(No.) Raw reads	未注释(No.) Unannotated reads	比对基因组(No.) Mapped reads	Mapped reads(No.)(+)	Mapped reads(No.)(-)
CKS1	20 323 459	11 780 590	6 651 941(56.47%)	4 657 837(39.54%)	1 994 104(16.93%)
CKS2	26 786 759	15 030 630	8 629 588(57.41%)	6 024 639(40.08%)	2 604 949(17.33%)
D1S1	24 608 369	15 749 092	9 383 706(59.58%)	6 465 884(41.06%)	2 917 822(18.53%)
D1S2	27 329 665	12 628 838	7 253 307(57.43%)	5 017 621(39.73%)	2 235 686(17.70%)
D3S1	23 774 366	13 593 925	8 105 601(59.63%)	5 602 493(41.21%)	2 503 108(18.41%)
D3S2	24 659 994	16 227 826	9 432 928(58.13%)	6 564 862(40.45%)	2 868 066(17.67%)
D6S1	20 390 661	12 698 896	7 374 764(58.07%)	5 118 466(40.31%)	2 256 298(17.77%)
D6S2	29 970 025	20 401 262	1 204 318(59.03%)	8 365 233(41.00%)	3 677 948(18.03%)
D12S1	19 125 153	11 250 821	6 432 861(57.18%)	4 485 667(39.87%)	1 947 194(17.31%)
D12S2	16 397 780	9 959 362	5 821 411(58.45%)	4 043 735(40.60%)	1 777 676(17.85%)
D24S1	23 918 954	13 507 619	8 016 126(59.35%)	5 552 889(41.11%)	2 463 237(18.24%)
D24S2	21 703 647	13 020 489	7 802 314(59.92%)	5 390 747(41.40%)	2 411 567(18.52%)
D48S1	24 846 254	14 205 255	8 394 949(59.10%)	5 828 626(41.03%)	2 566 323(18.07%)
D48S2	23 479 173	14 135 734	8 612 998(60.93%)	6 004 602(42.48%)	2 608 396(18.45%)



注: A. 不同处理下鉴定的 Known-miRNAs 和 Novel-miRNAs 的数量; B. 长度分布。CK 为 CKS1 和 CKS2 的并集, 其余处理同理。
Note: A. Numbers of known-miRNAs and novel-miRNAs identified under different treatments; B. The length distribution. CK is the union of CKS1 and CKS2, and other treatments are the same.

图 1 miRNAs 鉴定结果
Figure 1 Results of identified miRNAs

2.3 miRNA 家族分析

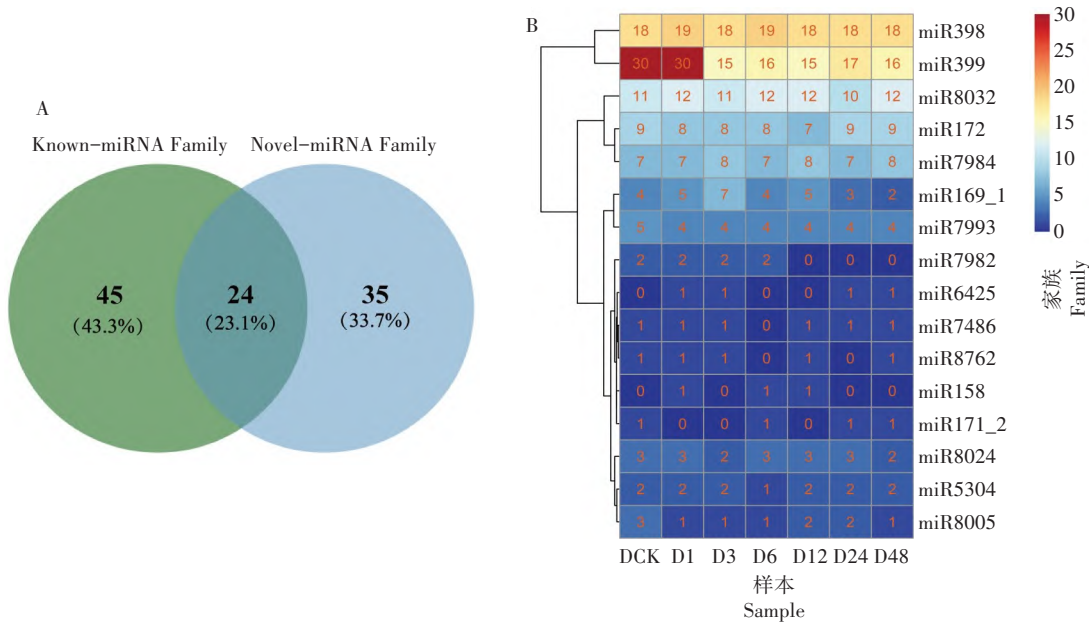
miRNA 在物种间具有高度保守性, 基于序列的相似性对检测到的 Known-miRNA 和 Novel-miRNA 进行 miRNA 家族分析, 研究 miRNA 在进化中的保守性。250 个已知 miRNAs 属于 69 个家族, 166 个新预测 miRNAs 属于 59 个家族。总共鉴定到 104 个 miRNA 家族, 其中有 24 个家族是 Known-miRNA 和 Novel-miRNA 所共有的(表 5 和图 2A)。

miR399 家族含有的 Known-miRNA 最多, 有 30

个, 其次为 miR398 含有 15 个 Novel-miRNA。在处理中, 共有 16 个家族的 miRNA 发生了变化, 其中 miR399 家族的 miRNA 在干旱处理 3 h 时明显减少, miR7982 家族的 miRNA 在干旱处理 6 h 后未检测到, miR7993 和 miR8005 家族的 miRNA 也在干旱处理后出现不同程度的减少, miR169_1 家族的 miRNA 在干旱 3 h 前数目增加, 3 h 后开始减少, 另外, miR158 和 miR6425 家族的 miRNA 在干旱处理后才被检测到(图 2B)。

表 5 miRNA 家族统计
Table 5 Summary of miRNA family

类型 Type	已知 miRNA Known-miRNA	新预测 miRNA Novel-miRNA
miRNA	250	166
家族 Family	69	59
含 1 个 miRNA 的家族 Family containing only one miRNA	24	23
含 2 个 miRNA 的家族 Family containing two miRNAs	18	13
含 3 个 miRNA 的家族 Family containing three miRNAs	7	11
含 3 个以上 miRNA 的家族 Family with more than three miRNAs	19	12



注: A. Known-miRNAs 和 Novel-miRNAs 中的家族韦恩分析; B. 各处理间有差异的 miRNA 家族热图分析。

Note: A. Venn analysis of known-miRNAs and novel miRNA-family; B. Heat map analysis of miRNA families with differences among different treatments.

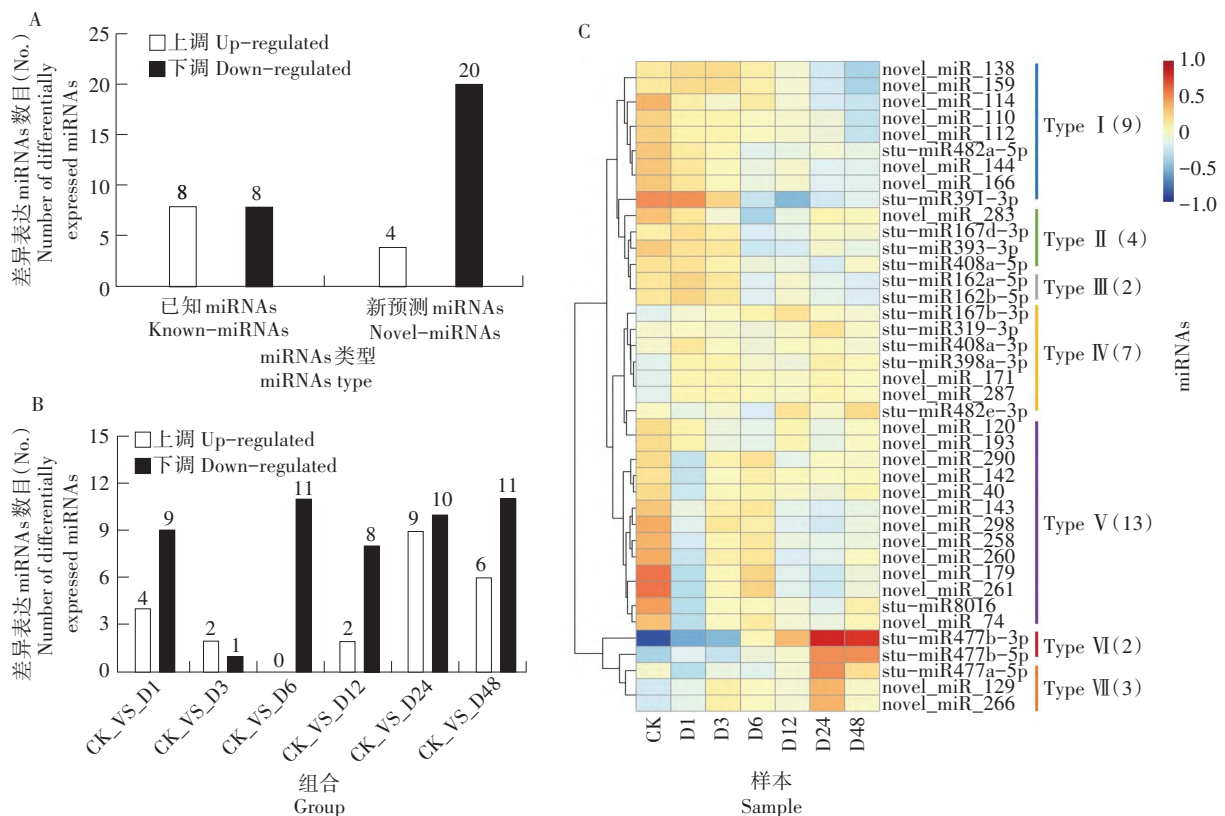
图 2 miRNA 家族分析
Figure 2 Analysis of miRNA family

2.4 干旱胁迫响应相关 miRNA 差异表达分析

对鉴定到的 621 个 miRNAs 进行差异表达分析, 共鉴定到 40 个差异表达 miRNA, 其中上调表达的 12 个, 下调表达的 28 个(图 3A)。干旱处理前 6 h, 上调的 miRNA 逐渐减少, 6 h 时全为下调表达的 miRNA, 6 h 后逐渐增加; 干旱处理 3 h 时, 下调的 miRNA 减少, 之后增加, 干旱处理 3 h 时的差异 miRNA 数目最少(图 3B)。

对筛选出的 40 个差异表达 miRNA 做层次聚类分析, 将具有相同或相似表达行为的 miRNA 进行聚类, 总共分为 7 大类。Type I 为下调表达的 miRNA, 其中 2 个 Known-miRNA (stu-miR482a-5p 和 stu-miR391-3p), 7 个为 Novel-miRNA, 他们大多在干旱胁迫 6 h 及以后表达量下降; Type II 为先下调后上调表达的 miRNA, 其中有 3 个 Known-miRNA, 1 个 Novel-miRNA, 他们在干旱胁迫 3~

12 h 被下调, 12 h 后开始上调表达; Type III 为先下调后上调再下调表达的 miRNA, 2 个都为 Known-miRNA (stu-miR162a-5p 和 stu-miR162b-5p), 他们在干旱胁迫 3~6 h 下调表达, 12 h 被上调, 12 h 后又下调; Type IV 为表达无明显规律的 miRNA, 总体呈上升趋势, 包括 5 个 Known-miRNA 和 2 个 Novel-miRNA; Type V 为先下调后上调再下调再上调的 miRNA, 共 13 个, 大多数都是 Novel-miRNA, 只有 1 个 Known-miRNA (stu-miR8016); Type VI 为上调表达的 miRNA, 2 个都是 Known-miRNA (stu-miR477b-3p 和 stu-miR477b-5p), 他们在干旱胁迫 6 h 开始逐渐被上调表达; Type VII 为先上调后下调表达的 miRNA, 包括 1 个 Known-miRNA (stu-miR477a-5p) 和 2 个 Novel-miRNA, 他们在 24 h 后逐渐开始下调表达(图 3C)。



注: A 和 B. 差异表达 miRNAs 数目统计; C. 差异表达 miRNAs 聚类分析。

Note: A and B. Summary of differentially expressed miRNAs; C. Hierarchical clustering of differentially expressed miRNAs.

图 3 响应干旱胁迫 miRNAs 差异表达分析

Figure 3 Analysis of differentially expressed miRNAs in response to drought stress

2.5 miRNA 靶基因预测

靶基因的预测对于理解 miRNA 的功能至关重要。鉴定到的 621 个 miRNAs 中有 555 个 miRNAs 被预测到了共 9 222 个靶基因, 其中分别有 280 个 Known-miRNAs 和 275 个 Novel-miRNAs 被预测到

了 6 889 个和 3 010 个靶基因(表 6)。对靶标基因只有 1 个和 2 个的 miRNA 分析发现, Known-miRNA 中同一家族的 miRNA 靶基因相同, 多个不同的 Novel-miRNA 靶标同一基因, 推测靶标同一基因的不同 Novel-miRNA 可能属于同一家族。

表 6 miRNA 靶基因数目预测统计
Table 6 Prediction statistics of the number of miRNA target genes

样本名 Sample name	类型 Type	总 miRNA All miRNA	预测到靶基因的 miRNA miRNA with target	靶基因 Target gene
CK	已知 miRNA	286	262	5 984
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D1	已知 miRNA	291	265	5 937
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D3	已知 miRNA	275	248	6 317
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D6	已知 miRNA	272	247	5 678
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D12	已知 miRNA	269	246	5 979
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D24	已知 miRNA	272	247	6 183
	新预测 miRNA	313	275	3 010
D48	已知 miRNA	265	241	5 735
	新预测 miRNA	313	275	3 010
All	已知 miRNA	308	280	6 889
	新预测 miRNA	313	275	3 010
总计 Total		621	555	9 222

2.6 差异表达 miRNA 的靶基因及 KEGG 通路富集分析

对差异表达的 40 个 miRNAs 的靶基因进行分析, 共有 16 个 Known-miRNAs 和 21 个 Novel-miRNAs 分别预测到 558 和 631 个靶基因。联合靶基因预测结果和转录组数据, 对上述 miRNA 所对应的靶基因与转录组中差异表达的基因取交集, 最终分别对 16 个已知(表 7)和 17 个新 miRNA(表 8)的 81 个和 70 个靶基因进行了功能注释。

由表 7 可以看出, 靶基因中大多是与植物生长代谢有关的蛋白基因, 例如: 细胞色素 P450、GDSL 脂酶、NADH 依赖性谷氨酸合成酶和 UDP 糖基转移酶超家族蛋白。参与马铃薯干旱胁迫响应及氧化还原的一些蛋白和酶类有漆酶、2-氧戊二

酸和铁(II)依赖性加氧酶超家族蛋白、氧化还原酶家族蛋白、锌指(C3HC4 型环指)家族蛋白和 CDPK 相关激酶等。还有一些与激素相关基因, 例如: 赤霉素生物合成所需基因、类生长素抗性基因和乙烯反应/乙烯调节核蛋白(ERT2)。同时, 预测到一些参与植物生长发育及胁迫响应的转录因子, 例如: TCP 家族转录因子、转录因子 bHLH61 和转录调节因子。另外, 还有与植物昼夜节律相关蛋白 TIMLESS 和一些保守的未被表征的假定蛋白。从注释结果来看, 一个 miRNA 可靶标多个基因, 不同 miRNA 也可能调控同一基因。

新的 miRNA 预测出的靶基因参与马铃薯干旱胁迫的大多为各种蛋白和酶类。例如: ARM 重复序列超家族蛋白、含有 P-环的核苷三磷酸水解酶

超家族蛋白、2-氧戊二酸和铁(II)依赖性加氧酶超家族蛋白、受体凝集素激酶(RLK)、真核天冬氨酰蛋白酶家族蛋白、转录因子 B3 家族蛋白、蛋白磷酸酶 2C 家族蛋白、bHLH DNA 结合超家族蛋白以及 EIN3 结合 F-box 蛋白等(表 8)。没有预测到参与胁迫响应的直接靶标转录因子。但从预测结果来看，属于同一家族的新 miRNA 的靶基因同源性较高。

表 7 差异表达已知 miRNAs 及其靶基因

Table 7 Differential expression of known-miRNAs and their target genes

家族 Family	miRNA 名称 miRNA name	靶基因编号 Target gene ID	靶基因注释 Gene description
miR159	stu-miR319-3p	Soltu.DM.01G040400.3;	含卤代酸脱卤素酶样水解酶家族蛋白
		Soltu.DM.01G040400.2	
		Soltu.DM.07G025070.1;	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶
		Soltu.DM.04G032050.1	
		Soltu.DM.01G025250.2	碳酸氢盐转运蛋白家族
		Soltu.DM.07G020450.1;	TCP 家族转录因子
		Soltu.DM.07G023850.1	
miR162_1	stu-miR162a-5p	Soltu.DM.10G004690.2	TCP 结构域蛋白
		Soltu.DM.04G034380.1;	丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白
		Soltu.DM.04G034390.1	
miR162_1	stu-miR162b-5p	Soltu.DM.10G025120.1	F-box 家族蛋白
		Soltu.DM.04G034380.1;	丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白
		Soltu.DM.04G034390.1	
miR167_1	stu-miR167b-3p	Soltu.DM.10G025120.1	F-box 家族蛋白
		Soltu.DM.08G002190.1	尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 74E2
		Soltu.DM.01G028020.1	姐妹染色单体内聚力 1 蛋白
		Soltu.DM.03G023110.1	永恒的昼夜节律家族蛋白
miR167_1	stu-miR167d-3p	Soltu.DM.10G017220.1	类生长素抗性
		Soltu.DM.01G036130.1	转导蛋白/WD40 重复序列样超家族蛋白
		Soltu.DM.04G034510.3;	赤霉素需要
		Soltu.DM.04G034540.1;	
		Soltu.DM.04G034510.2	
		Soltu.DM.03G004310.2	自由基 SAM 超家族蛋白
		Soltu.DM.03G031080.1	假想蛋白
		Soltu.DM.07G005750.1	磷脂酶 A2 家族蛋白
		Soltu.DM.04G021700.1	DNA 酶 I 样超家族蛋白
miR393	stu-miR393-3p	Soltu.DM.05G026360.1;	假想蛋白
		Soltu.DM.10G025000.1;	
		Soltu.DM.10G025590.1	
miR398	stu-miR398a-3p	Soltu.DM.02G021080.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.10G002380.1	含卤代酸脱卤素酶样水解酶家族蛋白
		Soltu.DM.08G027950.1	细胞色素 P450
miR408	stu-miR408a-5p	Soltu.DM.10G027490.1	核苷酸糖转运蛋白家族蛋白
		Soltu.DM.04G013670.1	GDSL 脂酶
miR408	stu-miR408a-3p	Soltu.DM.07G000790.1	四三肽重复序列样超家族蛋白
		Soltu.DM.05G022410.1	漆酶

续表 7

家族 Family	miRNA 名称 miRNA name	靶基因编号 Target gene ID	靶基因注释 Gene description
miR477	stu-miR477a-5p	Soltu.DM.05G022670.1	HXXD 型酰基转移酶家族蛋白
		Soltu.DM.04G005930.1	RING/FYVE/PHD 锌指超家族蛋白
		Soltu.DM.03G018310.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.06G010630.1	转录因子 bHLH61
miR477	stu-miR477b-3p	Soltu.DM.11G003820.1	β -己糖胺酶
		Soltu.DM.02G014420.5	衰老相关基因
		Soltu.DM.05G003980.1;	双向氨基酸转运蛋白
		Soltu.DM.05G003990.1	
miR477	stu-miR477b-5p	Soltu.DM.03G022630.1	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性谷氨酸合成酶
		Soltu.DM.07G028660.1	萜类环化酶/蛋白异丙基转移酶超家族蛋白
		Soltu.DM.11G024700.1	异亮氨酸谷氨酰胺结构域
		Soltu.DM.09G026240.1	2-氧戊二酸和铁(II)依赖性加氧酶超家族蛋白
		Soltu.DM.06G010630.1	转录因子 bHLH61
		Soltu.DM.03G018310.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.05G001530.1	UDP 糖基转移酶超家族蛋白
miR482	stu-miR482e-3p	Soltu.DM.10G028630.1	假想蛋白
		Soltu.DM.11G007040.1;	含 NB-ARC 结构域的抗病蛋白
		Soltu.DM.04G004930.1;	
		Soltu.DM.04G006380.1;	
		Soltu.DM.04G005300.1;	
		Soltu.DM.04G005310.1;	
miR482	stu-miR482a-5p	Soltu.DM.04G013200.1	
		Soltu.DM.01G031420.1	转录调节因子
		Soltu.DM.02G010790.1	氯离子通道 B
		Soltu.DM.08G017480.2	天冬氨酸转氨酶
		Soltu.DM.03G029600.1	可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子衔接蛋白
		Soltu.DM.09G026620.1	萌发素类蛋白
		Soltu.DM.12G029890.1	RING/U-box 超家族蛋白
Unknown	stu-miR391-3p	Soltu.DM.01G017520.1	假想蛋白
		Soltu.DM.08G024710.1	氧化还原酶家族蛋白
		Soltu.DM.05G019830.1	G-box 结合因子
		Soltu.DM.02G026990.2	锌指(C3HC4 型环指)家族蛋白
		Soltu.DM.09G017330.1	含有 SMAD/FHA 结构域的蛋白质
		Soltu.DM.01G048750.1	巨大 G 蛋白
		Soltu.DM.01G036130.1	转导蛋白/WD40 重复序列样超家族蛋白
		Soltu.DM.02G017040.1;	五三肽重复序列超家族蛋白
		Soltu.DM.01G041600.1	
		Soltu.DM.04G011880.1	钙调素结合
		Soltu.DM.02G015900.2	嘌呤生物合成
		Soltu.DM.05G024020.1	四三肽重复序列样超家族蛋白
		Soltu.DM.07G023560.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.02G002920.1	乙烯反应/乙烯调节核蛋白(ERT2)
Unknown	stu-miR8016	Soltu.DM.01G035520.1	CDPK 相关激酶
		Soltu.DM.04G032150.1	FAD/NAD(P)结合氧化还原酶家族蛋白

表 8 差异表达新的 miRNAs 及其靶基因
Table 8 Differential expression of novel-miRNAs and their target genes

家族 Family	miRNA 名称 miRNA name	靶基因编号 Target gene ID	靶基因注释 Gene description
miR395	novel_miR_114	Soltu.DM.02G031330.1	分支酸变位酶1
miR396	novel_miR_120	Soltu.DM.04G033610.1	谷氨酸受体 2.9
		Soltu.DM.03G009700.1	ARM 重复序列超家族蛋白
		Soltu.DM.02G020920.4	含有 P-环的核苷三磷酸水解酶超家族蛋白
		Soltu.DM.02G014580.2;	2-氧戊二酸和铁(II)依赖性加氧酶超家族蛋白
		Soltu.DM.02G014510.1	
		Soltu.DM.07G022780.1	锚蛋白重复家族蛋白
		Soltu.DM.02G023520.1	VPS35 同源物 A
		Soltu.DM.01G027830.1	碱性螺旋-环-螺旋 DNA 结合超家族蛋白
miR396	novel_miR_144	Soltu.DM.04G033630.1;	谷氨酸受体 2.9
		Soltu.DM.04G033610.1	
		Soltu.DM.01G049380.1	含 BTB/POZ 结构域的蛋白质
		Soltu.DM.12G009000.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.02G020920.4	含有 P-环的核苷三磷酸水解酶超家族蛋白
miR396	novel_miR_166	Soltu.DM.12G009000.1	保守的假想蛋白
		Soltu.DM.04G033630.1;	谷氨酸受体 2.9
		Soltu.DM.04G033610.1	
		Soltu.DM.01G049380.1	含 BTB/POZ 结构域的蛋白质
miR396	novel_miR_193	Soltu.DM.07G022780.1	锚蛋白重复家族蛋白
		Soltu.DM.02G014510.1;	2-氧戊二酸和铁(II)依赖性加氧酶超家族蛋白
		Soltu.DM.02G014580.2	
		Soltu.DM.01G027830.1	碱性螺旋-环-螺旋 DNA 结合超家族蛋白
		Soltu.DM.02G023520.1	VPS35 同源物 A
		Soltu.DM.04G033610.1	谷氨酸受体 2.9
		Soltu.DM.03G009700.1	ARM 重复序列超家族蛋白
		Soltu.DM.02G020920.4	含有 P-环的核苷三磷酸水解酶超家族蛋白
miR397	novel_miR_171	Soltu.DM.09G001890.1	受体凝集素激酶
		Soltu.DM.09G001980.1;	漆酶
		Soltu.DM.06G032550.1	
		Soltu.DM.09G001920.1;	真核天冬氨酰蛋白酶家族蛋白
		Soltu.DM.01G035170.1	
		Soltu.DM.09G004510.1	同源盒
		Soltu.DM.10G019900.1	漆酶/二酚氧化酶家族蛋白
miR397	novel_miR_287	Soltu.DM.09G004510.1	同源盒
		Soltu.DM.01G035170.1;	真核天冬氨酰蛋白酶家族蛋白
		Soltu.DM.09G001920.1	
		Soltu.DM.10G019900.1	漆酶/二酚氧化酶家族蛋白
		Soltu.DM.06G032550.1;	漆酶
		Soltu.DM.09G001980.1	
		Soltu.DM.09G001890.1	受体凝集素激酶

续表 8

家族	miRNA 名称	靶基因编号	靶基因注释
Family	miRNA name	Target gene ID	Gene description
miR1511	novel_miR_159	Soltu.DM.04G029750.1	隐花色素
		Soltu.DM.10G007120.1	碱性磷酸酶样家族蛋白
		Soltu.DM.01G049720.1	G-box 结合因子
		Soltu.DM.07G025290.1	有机阳离子/肉碱转运蛋白 4
		Soltu.DM.05G005810.1	含 NB-ARC 结构域的抗病蛋白
miR1511	novel_miR_138	Soltu.DM.07G025290.1	有机阳离子/肉碱转运蛋白 4
		Soltu.DM.05G005810.1	含 NB-ARC 结构域的抗病蛋白
		Soltu.DM.01G049720.1	G-box 结合因子
miR5284	novel_miR_258	Soltu.DM.02G032380.1	半乳糖基转移酶样
Unknown	novel_miR_261	Soltu.DM.08G012140.1	EIN3 结合 F-box 蛋白
Unknown	novel_miR_283	Soltu.DM.03G037720.1	α -甘露糖苷酶
		Soltu.DM.05G002880.2	蛋白激酶超家族蛋白
		Soltu.DM.10G030180.1	光系统 II BY
		Soltu.DM.08G007450.1	鸟氨酸 δ 氨基转移酶
Unknown	novel_miR_129	Soltu.DM.10G030180.1	光系统 II BY
		Soltu.DM.07G019740.1	植物合成素
Unknown	novel_miR_266	Soltu.DM.07G019740.1	植物合成素
		Soltu.DM.10G030180.1	光系统 II BY
Unknown	novel_miR_110	Soltu.DM.02G017450.1	端粒酶激活蛋白 Est1
		Soltu.DM.02G028530.1;	S-腺苷-L-蛋氨酸依赖性甲基转移酶超家族蛋白
		Soltu.DM.02G028540.1	
		Soltu.DM.08G002450.1	转录因子 B3 家族蛋白
Unknown	novel_miR_112	Soltu.DM.09G006870.1	蛋白磷酸酶 2C 家族蛋白
		Soltu.DM.08G002450.1	转录因子 B3 家族蛋白
		Soltu.DM.09G006870.1	蛋白磷酸酶 2C 家族蛋白
		Soltu.DM.02G028540.1;	S-腺苷-L-蛋氨酸依赖性甲基转移酶超家族蛋白
		Soltu.DM.02G028530.1	
		Soltu.DM.02G017450.1	端粒酶激活蛋白 Est1
Unknown	novel_miR_179	Soltu.DM.08G012140.1	EIN3 结合 F-box 蛋白

在生物体内，不同的基因相互协调来行使生物学功能。将差异表达 miRNA 靶基因的通路注释进行富集分析，选取富集显著性最可靠(即 Q value 最小)的前 20 个通路进行结果展示(图 4)。差异表达 miRNA 的靶基因主要富集的前五个 KEGG 通路有谷胱甘肽代谢、倍半萜和三萜生物合成、其他类型的 O-聚糖生物合成、脂肪酸伸长率和类固醇生物合成。其中，谷胱甘肽具有抗氧化和整合解毒作用，可防止自由基、过氧化物、脂质过氧化物和重金属等活性氧对重要细胞成分的损伤，在植物应对干旱胁迫中发挥重要作用。差异表达 miRNA 靶基因在苯丙烷代

谢通路富集，苯丙烷代谢是重要的植物次生代谢途径之一，其代谢产物，如木质素、类黄酮、花青素和有机酸等，在调控植物生长发育及对非生物胁迫响应中发挥重要功能。在干旱胁迫下，植物通过释放 α -亚麻酸重塑细胞膜的流动性，进而应答干旱胁迫。本研究中，差异表达 miRNA 靶基因通路也在 α -亚麻酸代谢途径富集。另外，还在细胞信号转导重要组分鞘脂代谢通路、内质网中的蛋白加工通路、氨基酸生物合成以及基础转录因子等通路中富集。

2.7 miRNA 及其靶标的 qRT-PCR 表达验证

为了检测测序结果的可靠性，选取 0，3，12

和 48 h 4 个处理时间点, 使用 qRT-PCR 对 6 个 miRNA(包括 3 个已知和 3 个新的 miRNA)进行表达

模式分析。定量表达结果与测序数据的 miRNA 表达趋势一致(图 5), 表明测序结果真实可靠。

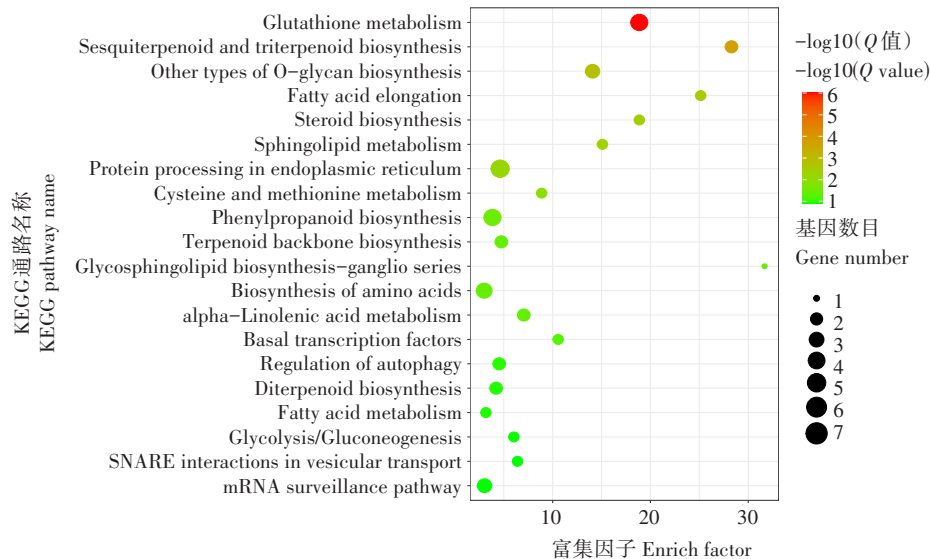
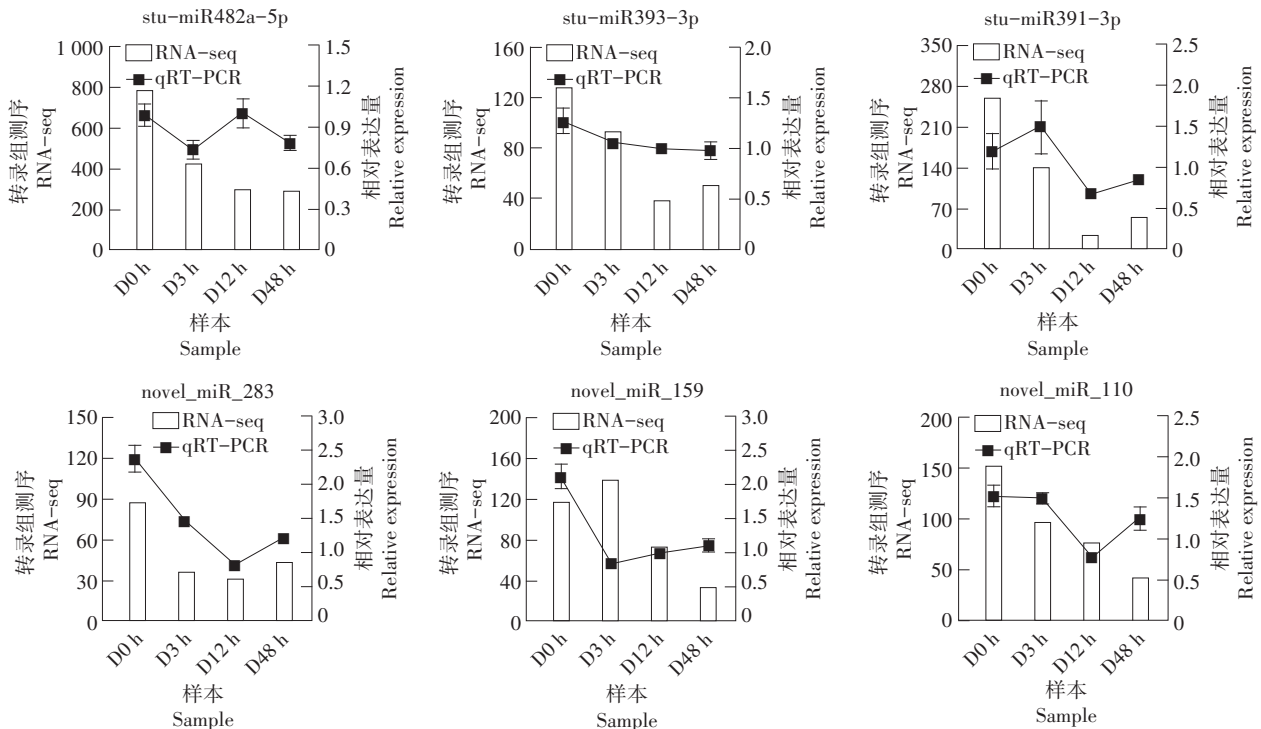


图4 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 通路富集

Figure 4 Enrichment of KEGG pathway of target genes with differential expressed miRNA



注: 误差线表示每个处理下对 miRNAs 定量结果的标准差。下同。

Note: Error bar represents standard deviation of the quantitative results of miRNAs under each treatment. The same below.

图5 miRNA 测序及 qRT-PCR 结果

Figure 5 miRNA sequencing and qRT-PCR results

miRNA对其靶标转录后调控是通过靶标剪切来实现的, 因此为了验证miRNA对靶标表达的调控作用, 本研究对上述miRNA靶标基因的表达变化进行了qRT-PCR的验证及分析。大多数靶标的表达表现出与miRNA相反的趋势, 例如: *stu-miR482a-5p*、*novel_miR_159*和*novel_miR_110*在干旱胁迫后表现为先下调后上调, 其靶基因*StCLC-B*和*StAST*、*StALPL*和*StCYP*以及*StPP2C*的相对表达量则表现出先升高后下降的趋势, *novel_miR_110*的靶基因

*StACL5*在干旱处理48 h内的表达量呈一直上升趋势; *stu-miR393-3p*在干旱胁迫后表现为下调, 而其靶基因*StCHP1*和*StCHP2*表现为上调; *stu-miR391-3p*在干旱胁迫前12 h表现为下调, 在48 h略有上升, 其靶基因*StELGP*和*StGBF*的相对表达量则在前12 h上升, 之后逐渐下降; *novel_miR_283*的相对表达量在前12 h下降, 之后升高, 其靶基因*StPrp4*的相对表达量在干旱48 h内呈上升趋势, 而另一靶基因*StpsbY*的相对表达量则呈下降趋势(图6)。

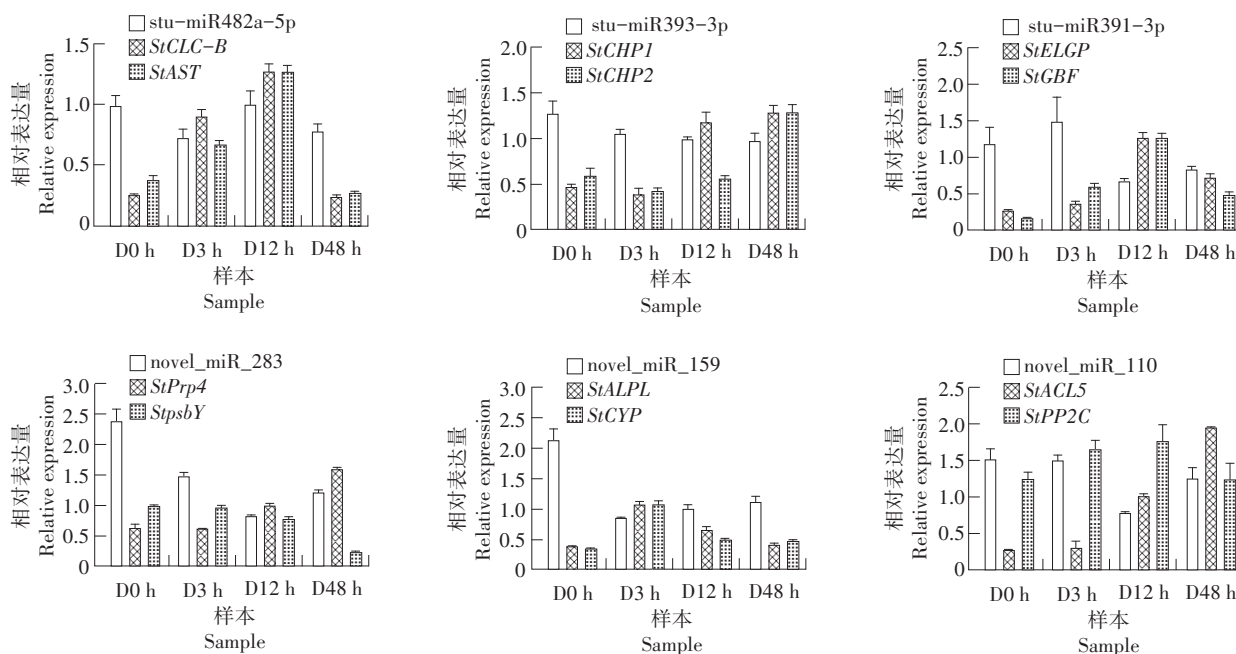


图6 miRNA及其靶基因的相对表达量

Figure 6 Relative expression of miRNA and their target genes

3 讨论

马铃薯为浅根系作物, 其整个生育时期都有可能受到干旱胁迫的影响。目前, 植物对干旱胁迫的响应多集中在离子响应、脱落酸(Absciscic acid, ABA)依赖和非依赖途径以及转录因子等研究^[3,18,19], 关于miRNA调控马铃薯干旱胁迫响应的报道较少^[14-16,20]。因此, 挖掘马铃薯中响应干旱胁迫的miRNA, 进一步解析miRNA及其靶基因之间的调控作用, 为后期miRNA的功能验证奠定基础, 同时为阐明马铃薯参与干旱响应的分子机制

提供理论依据。基于此, 本研究通过20% PEG6000模拟干旱处理0, 1, 3, 6, 12, 24和48 h共7个时间点的14个马铃薯组培幼苗样品进行small RNA测序。测序结果中, Known-miRNA与Novel-miRNA的长度分别在21和24 nt的序列最多(图1), 这与Zhang等^[15]、李莹等^[21]、Xu等^[22]和Wu等^[23]在马铃薯、枣树、拟南芥和紫色马铃薯块茎中的报道一致。推测miRNA的长度分布与物种、取材部位以及处理条件有关。此外, 还发现长度为21 nt的Known-miRNA在干旱胁迫3 h后明显减少(图1), 说明马铃薯在干旱胁迫3 h时即对miRNA进行大量

调控。

miR319被报道其参与植物叶片发育、花器官形成、花粉发育、衰老、昼夜节律和激素信号转导等多种生长发育过程的调控^[24]。本研究中, *stu-miR319-3p*在干旱胁迫24 h时显著上调(图3), 与拟南芥^[7]以及紫花苜蓿^[25]中在根和叶中都上调表达结果一致。靶基因预测有TCP家族转录因子、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶和碳酸氢盐转运蛋白家族等, 这与前人报道的miR159/319家族的miRNA通过调控MYB/TCP转录因子来响应干旱胁迫一致^[24,26]。但是, 关于马铃薯中miR319是否及如何与其他激酶和转运蛋白等调控还有待进一步研究。

miR398和miR408家族在植物中较为保守, 参与植物生长、发育和胁迫响应的调节, 在植物遭到胁迫时对植物的生长发育过程发挥重要作用。在本研究中, *stu-miR398a-3p*和*stu-miR408a-3p*的表达量在PEG处理1 h后即出现显著上升(图3), 这与蒺藜苜蓿、拟南芥中miR398和miR408上调表达一致^[27,28]。*stu-miR408a-5p*的表达量在PEG处理24 h后出现显著下调(图3), 这与水稻干旱胁迫后miR408下调表达一致^[8]。因此, 干旱胁迫下miR398和miR408的表达模式变化与物种、品种之间抗性以及成员有关。对*stu-miR398a-3p*、*stu-miR408a-3p*和*stu-miR408a-5p*的靶基因预测结果显示(表7), 包括细胞色素P450(*CYP450*)、漆酶(LAC)、GDSL脂酶以及四三肽重复序列样超家族蛋白等, 这与前人已报道的拟南芥miR408的靶基因有*Laccase*和蒺藜苜蓿中miR398的靶基因有*COX5b*有相似之处。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 其在防御反应以及木质素和植物次生壁合成过程起重要作用。已有报道表明, *AtLAC4*过量表达植株在干旱处理后耐旱能力比野生型明显增强^[29]。因此, 在后续的研究中, 可以进一步关注miRNA及其靶基因LAC在马铃薯干旱胁迫响应中的调控机理。也表明在干旱胁迫过程中, 同一靶基因可能受到多个miRNA同时调控以应答胁迫环境。

miR482是植物中一个古老且相对保守的miRNA超家族, 在植物的生长发育和抗病抗逆过程中发挥重要的作用^[30]。在本研究中, *stu-miR482a-5p*在干

旱处理6 h后被显著下调(图3), 与miR482在大豆中下调一致^[31]; 但*stu-miR482e-3p*在胁迫处理48 h后被显著上调(图3), 与盐胁迫下miR482.2在杨树^[32]和干旱胁迫下miR482在大豆^[33]中被上调一致。在靶基因预测中, *stu-miR482a-5p*靶向基因有转录调节因子(Transcription regulators, TRs)、类萌发素蛋白(Germin-like proteins, GLPs)以及氧化还原酶家族蛋白(Oxidoreductase family protein)等; 而*stu-miR482e-3p*则主要靶向含NB-ARC结构域的抗病蛋白(NB-ARC domain-containing disease resistance protein)(表7)。关于该家族成员是如何协同植物各类生长发育以及代谢相关蛋白和转录因子, 去抵御干旱及其他非生物胁迫, 还有待进一步研究。

尽管, 本研究鉴定出一些响应马铃薯干旱胁迫的miRNA, 他们主要通过调节生物合成、生长代谢、氧化还原反应等过程来响应胁迫环境。但是, 挖掘出的这些miRNA是通过何种调控途径来响应干旱胁迫的分子机制研究, 还需进一步通过转基因等手段验证。本研究结果为后续深入研究miRNA调控马铃薯干旱胁迫响应的分子机制提供线索, 为抗旱种质资源的筛选和抗旱品种的选育提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 张卓珺. 干旱气候对农业生产的影响及气象服务对策[J]. 农业灾害研究, 2022, 12(2): 128-130.
- [2] Obidiegwu J E, Bryan G J, Jones H G, *et al.* Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 542.
- [3] 张辉, 黄月, 邵雨晴, 等. 马铃薯响应干旱胁迫的生理和分子遗传机理研究现状与展望[J]. 中国马铃薯, 2022, 36(2): 165-176.
- [4] 韩德鹏, 尹智宇, 杨蓓, 等. 干旱胁迫对冬播马铃薯现蕾期生理生化指标的影响[J]. 中国马铃薯, 2020, 34(2): 78-85.
- [5] Sharma R, Upadhyay S, Bhat B, *et al.* Abiotic stress induced miRNA-TF-gene regulatory network: a structural perspective[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 412-422.
- [6] Sunkar R, Zhu J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16

- (8): 2001–2019.
- [7] Liu H, Tian X, Li Y, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. RNA, 2008, 14 (5): 836–843.
- [8] Zhou L, Liu Y, Liu Z, *et al.* Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa* [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(15): 4157–4168.
- [9] Wei L, Zhang D, Xiang F, *et al.* Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedling [J]. International Journal of Plant Sciences, 2009, 170(8): 979–989.
- [10] Kantar M, Unver T, Budak H. Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression [J]. Functional and Integrative Genomics, 2010, 10(4): 493–507.
- [11] Kantar M, Lucas S J, Budak H. miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress [J]. Planta, 2011, 233(3): 471–484.
- [12] 雷其冬. 拟南芥 miR319-*TCP4* 调控植物应答干旱胁迫的分子机制研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.
- [13] 周小龙, 魏春阳, 黄佳, 等. miRNA398 调控烟草 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达 [J]. 烟草科技, 2014(4): 99–102.
- [14] Yang J, Zhang N, Ma C, *et al.* Prediction and verification of microRNAs related to proline accumulation under drought stress in potato [J]. Computational Biology and Chemistry, 2013, 46(4): 48–54.
- [15] Zhang N, Yang J, Wang Z, *et al.* Identification of novel and conserved microRNAs related to drought stress in potato by deep sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95489.
- [16] Yang J, Zhang N, Mi X, *et al.* Identification of miR159s and their target genes and expression analysis under drought stress in potato [J]. Computational Biology and Chemistry, 2014, 53(9): 204–213.
- [17] 石王, 红高, 艾高润. 茎环法与加 PolyA 尾法 PCR 在检测 MicroRNA 时引物设计的策略 [J]. 毒理学杂志, 2012, 26(5): 378–380.
- [18] Zhu J. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. Cell, 2016, 167(2): 313–324.
- [19] 刘圣宣, 程云霞, 刘腾飞, 等. ‘鄂马铃薯 3 号’对干旱胁迫早期响应的转录组分析 [J]. 中国马铃薯, 2021, 35(6): 481–488.
- [20] Shin S, Lee J, Kwon H. Genome-wide identification and characterization of drought responsive microRNAs in *Solanum tuberosum* L. [J]. Genes and Genomics, 2017, 39(11): 1193–1203.
- [21] 李莹, 孟宪巍, 马志航, 等. 枣树阶段转变相关 microRNA 家族的鉴定及其表达分析 [J]. 园艺学报, 2022, 49(1): 23–40.
- [22] Xu L, Hu Y, Cao Y, *et al.* An expression atlas of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science China-life Sciences, 2018, 61 (2): 178–189.
- [23] Wu X, Ma Y, Wu J, *et al.* Identification of microRNAs and their target genes related to the accumulation of anthocyanin in purple potato tubers (*Solanum tuberosum*) [J]. Plant Direct, 2022, 6(7): e418.
- [24] Martín-Trillo M, Cubas P. TCP genes: a family snapshot ten years later [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(1): 31–39.
- [25] 李跃. 紫花苜蓿对干旱的响应: 形态、生理以及 miRNA 组学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [26] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1): 19–53.
- [27] Trindade I, Capitão C, Dalmay T, *et al.* miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula* [J]. Planta, 2010, 231(3): 705–716.
- [28] Khraiweh B, Zhu J, Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819(2): 137–148.
- [29] 张盛春, 鞠常亮, 王小菁. 拟南芥漆酶基因 *AtLAC4* 参与生长及非生物胁迫响应 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 357–365.
- [30] Zhang Y, Waseem M, Zeng Z, *et al.* MicroRNA482/2118, a miRNA superfamily essential for both disease resistance and plant development [J]. The New Phytologist, 2021, 233(5): 2047–2057.
- [31] Kulcheski F R, de Oliveira L F, Molina L G, *et al.* Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 307.
- [32] Lu S, Sun Y, Chiang V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus* [J]. The Plant Journal, 2008, 55(1): 131–151.
- [33] Li H, Dong Y, Yin H, *et al.* Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-170>.