

引用格式:

彭艳, 刘跃武, 刘伯涵, 陈信波. 高温干旱胁迫下水稻花器官中敏感基因的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 13–21.

PENG Y, LIU Y W, LIU B H, CHEN X B. Screening of sensitive genes in floral organs of rice under heat and drought stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 13–21.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



高温干旱胁迫下水稻花器官中敏感基因的筛选

彭艳^{1,3}, 刘跃武², 刘伯涵³, 陈信波^{1*}

(1.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学信息与智能科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 3.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以水稻品种 N22 为材料, 通过数据库检索和文献挖掘, 筛选出 47 个在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下在花药和授粉雌蕊中均差异表达的敏感基因, 并对其进行表达模式分析和生物信息学分析。结果显示: 47 个敏感基因主要富集到 HSP20、HSP70、四肽重复、ClpA/B、DnaJ、FKBP 型肽脯氨酰顺反异构酶和 EF-hand 蛋白结构域, 且绝大多数敏感基因在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下的花药和授粉雌蕊中表达上调, 有利于水稻花器官对抗胁迫诱导的胞内蛋白损伤; 47 个敏感基因主要参与了与胁迫相关的生物学过程和代谢途径, 与类固醇激素受体的 HSP90 伴侣循环和蛋白质甲基化也有关。通过预测, 获得 13 个敏感基因的 28 个上游 miRNAs, 其中 osa-miR164、osa-miR156 和 osa-miR5162 可能是水稻生殖期间逆境胁迫下对水稻育性、抽穗、衰老以及磷脂代谢中起关键作用的 miRNAs。

关 键 词: 水稻; 高温胁迫; 高温干旱复合胁迫; 敏感基因; 花药; 授粉雌蕊

中图分类号: S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0013-09

Screening of sensitive genes in floral organs of rice under heat and drought stress

PENG Yan^{1,3}, LIU Yuewu², LIU Bohan³, CHEN Xinbo^{1*}

(1.Key Laboratory for Crop Gene Engineering of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China; 2.College of Information and Intelligence, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Using *Oryza sativa* cv. N22 as materials, a total of 47 differentially expressed sensitive genes were screened from anthers and pollinated pistils of rice under heat stress and combined heat and drought stresses by database retrieval and literature mining. The expression patterns and bioinformatics analysis of sensitive genes were performed. The results show that: (1) 47 sensitive genes were mainly enriched in HSP20, HSP70, Tetratricopeptide repeat, ClpA/B, DnaJ, FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain and EF-hand protein domains, and most of them were up-regulated in anthers and pollinated pistils under heat stress and combined heat and drought stresses, which were beneficial to the resistance of rice floral organs to stress-induced intracellular protein damage. (2) 47 sensitive genes were mainly involved in some stress-related biological processes and metabolic pathways. In addition, the sensitive genes were also related to HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors and protein methylation. (3) Based on prediction, 28 possible upstream miRNAs of 13 sensitive genes were obtained and miR164, miR156 and miR5162 might be the key miRNAs that play an important role in fertility, heading, senescence and phospholipid metabolism during rice

收稿日期: 2020-11-04

修回日期: 2021-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771701)

作者简介: 彭艳(1982—), 女, 湖南长沙人, 博士, 高级实验师, 主要从事水稻逆境生理与分子生物学研究, pengyan3759@163.com; *通信作者, 陈信波, 博士, 教授, 主要从事水稻逆境生理与分子生物学研究, xinbochen@live.cn

reproduction.

Keywords: rice; heat stress; combined heat and drought stress; sensitive genes; anthers; pollinated pistils

高温是限制植物生长和产量的关键因素之一^[1],而通常称为“伴生胁迫”的高温干旱复合胁迫在热带和亚热带的水稻主要种植区非常普遍。有研究^[2-4]表明,在复合胁迫条件下观察到的生理和分子水平反应与单独暴露于任何一种胁迫下的反应有较大的差异。生殖期(特别是开花期)被认为是对高温和干旱胁迫最敏感的时期^[5]。开花期高温会使水稻花期变短,花时分散,柱头上花粉的粒数、花粉萌发率、花粉活力、花药开裂系数以及结实率显著下降,进而影响产量^[6-9]。而开花期高温干旱复合胁迫能诱导花药异常开裂,导致柱头上萌发的花粉数量减少、育性下降,且胁迫持续的时间越长,育性越低,最终影响产量和品质^[5,10]。

植物 miRNAs 是一类由内源基因编码的大小约 20~24 nt 的非编码单链小分子 RNA,通过与 mRNA 3'-UTR 互补结合,导致 mRNA 降解或翻译抑制来调控基因的表达^[11]。近年来,随着分子生物学的发展,有学者发现许多水稻 miRNAs 在逆境胁迫中发挥着重要的作用。在高温胁迫下,过表达 miR169R-5P 能通过调节靶基因 *OsHAP2F* 的表达来增强水稻开花期的耐热性^[12]。本研究中,笔者拟通过数据库检索和文献挖掘,对高温胁迫和高温干旱复合胁迫下水稻(N22)花药和授粉雌蕊的转录组数据进行分析,旨在探寻在高温和高温干旱复合胁迫下花药和授粉雌蕊中均差异表达的敏感基因,通过分析其表达模式、染色体分布以及所富集的功能和参与的代谢途径,预测这些敏感基因可能受哪些上游 miRNAs 的调控,为水稻抗性新品种选育提供潜在的分子标记,同时也为完善 miRNAs 及关键基因在伴生胁迫下的调控机制提供依据。

1 数据来源与分析方法

1.1 数据来源

高温和高温干旱复合胁迫下水稻 N22 的花药和授粉雌蕊中基因表达谱数据来自 NCBI 数据库生物数据集 GSE57154^[13]和文献[14]。在生物数据集 GSE57154 中一共选取了 3 个处理的 14 个样本。对照处理包括 3 个正常生长的水稻花药样本

GSM1376277、GSM1376278、GSM1376279 和 3 个正常生长的水稻授粉雌蕊样本 GSM1376301、GSM1376302、GSM1376303,生长在自然光照条件下,相对湿度 75%~85%,昼、夜温度分别为 29、21℃。高温处理包括 3 个受高温胁迫的水稻花药样本 GSM1376295、GSM1376296 和 GSM1376297,其处理条件为:昼、夜温度分别设置为 38、21℃,相对湿度为 75%,07:30—08:30 从 29℃逐渐升高至 38℃,并保持在 38℃直至 14:30。高温干旱复合胁迫处理包括 3 个受高温干旱复合胁迫的水稻花药样本 GSM1376289、GSM1376290、GSM1376291 和 2 个高温干旱复合胁迫的水稻授粉雌蕊样本 GSM1376307、GSM1376308。高温干旱复合胁迫条件为:干旱胁迫从主穗抽穗前 5 d 开始,当水稻开花期剑叶相对含水率保持在 60%~70%时,38℃下热处理 6 h(08:30—14:30)。从文献[14]中收集高温胁迫下水稻授粉雌蕊中基因表达谱数据。其对照和高温处理的条件与生物数据集 GSE57154 的条件一致。

高温胁迫下响应的水稻 miRNAs 表达数据来自文献[15-16];干旱胁迫下响应的 miRNAs 表达数据来自文献[17-18];高温干旱复合胁迫响应的 miRNAs 表达数据来自文献[19]。

1.2 分析方法

1.2.1 差异表达分析

采用 GEO2R 对高温和高温干旱复合胁迫下水稻花药和授粉雌蕊的转录组数据进行差异表达分析,通过比较花药和授粉雌蕊中对照组数据和胁迫处理数据来筛选差异表达的基因。筛选的准则如下:

$$|\log_2 FC| \geq 1.0 \quad (1)$$

$$FDR < 0.05 \quad (2)$$

式中:FC(fold change)为倍数变化,FDR(false discovery rate)为错误发现率。同时满足公式(1)和(2)的基因即为差异表达基因(DEGs)。在高温和高温干旱复合胁迫下的花药和授粉雌蕊中均差异表达的基因即视为敏感基因。

为了鉴定高温、干旱和高温干旱复合胁迫下水稻中差异表达 miRNAs(DE-miRNAs),通过比较对

照组数据和胁迫处理数据来筛选具有差异表达的 miRNAs, 满足公式(1), 则视为高温、干旱和高温干旱复合胁迫下的 DE-miRNAs。

1.2.2 基因的功能分类和富集分析

利用生物信息学工具 STRING v11.0^[20]进行蛋白结构域、GO 功能、UP_KEYWORDS 以及 RCTM 通路的富集分析。选取满足公式(2)的注释和通路用于进一步分析。

1.2.3 敏感基因上游 miRNAs 的预测与高信度 miRNAs 的鉴定

利用植物 miRNAs 靶基因在线预测软件 psRNATarget^[21]对敏感基因的上游 miRNAs 进行预测。所有参数除将最大期望值设置为 3 外, 其他均按照软件所述设置严格的筛选标准, 敏感基因的 DNA 序列从 RAP-DB(<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)数据库中获取, miRNAs 数据库选择 miRBase Release 21 进行匹配。

获得预测的 miRNAs 后, 将其与在高温、干旱或高温干旱复合胁迫下水稻中的 DE-miRNAs 数据进行比较, 得到预测的 miRNAs 在干旱、高温、高温干旱复合胁迫下的差异表达数据, 这些差异表达的预测 miRNAs 即有可能是高温和高温干旱复合胁迫下水稻花药和授粉雌蕊中敏感基因的高信度 miRNAs。

1.2.4 维恩分析

通过在线工具“An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams”venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)编制 Venn 图。

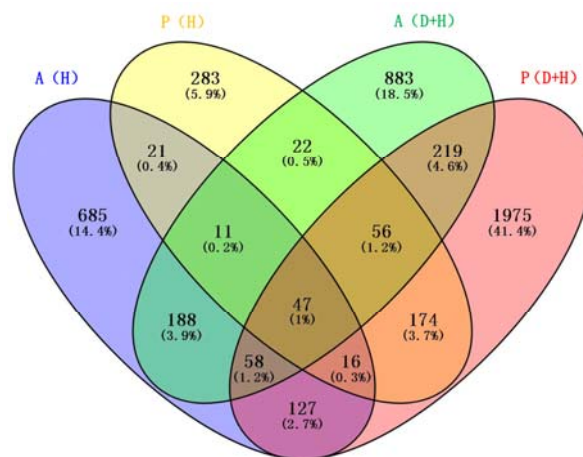
2 结果与分析

2.1 高温和高温干旱复合胁迫下水稻花药和授粉雌蕊中 DEGs 的鉴定与分析

高温胁迫下, 共有 1153 个基因在花药中差异表达, 其中 186 个上调, 967 个下调; 630 个基因在授粉雌蕊中差异表达, 其中上调的 259 个, 下调的 371 个。高温干旱复合胁迫下, 在花药中共鉴定出 1484 个基因差异表达, 其中表达上调的基因 1185 个, 下调的 299 个; 2672 个基因在授粉雌蕊中差异表达, 其中上调的 1381 个, 下调的 1291 个。这些结果表明, 无论是在花药还是授粉雌蕊中, 高

温干旱复合胁迫下 DEGs 的数量均明显高于单一的高温胁迫; 高温胁迫下在花药和授粉雌蕊中表达上调的基因数量明显低于下调基因的数量, 而高温干旱复合胁迫下的结果却刚好相反, 上调的基因数明显高于下调的基因数。说明无论是花药还是授粉雌蕊都主要是通过下调基因的表达来抵御高温胁迫, 通过上调基因的表达来抵御高温干旱复合胁迫。

高温和高温干旱复合胁迫下花药和授粉雌蕊中 DEGs 的分布见图 1。结果显示, 共有 304 个基因在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下的花药中差异表达; 在授粉雌蕊中, 有 293 个基因既在高温胁迫下差异表达, 又在高温干旱复合胁迫下差异表达; 高温胁迫下, 在花药和授粉雌蕊中均差异表达的基因有 95 个; 在高温干旱复合胁迫下, 有 380 个基因在花药和授粉雌蕊中差异表达。但仅有 47 个基因在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下的花药和授粉雌蕊中均差异表达, 说明这 47 个差异表达的基因在胁迫下的水稻花药和授粉雌蕊中起着非常重要的作用, 是胁迫下花器官中的敏感基因。



A、P、H、D+H 分别代表花药、授粉雌蕊、高温胁迫和高温干旱复合胁迫。

图 1 高温和高温干旱复合胁迫下水稻花药和授粉雌蕊中 DEGs 的韦恩图

Fig. 1 The Venn diagram analysis on the DEGs in rice anthers and pollinated pistils under heat stress and combined heat and drought stress

2.2 47 个敏感基因的表达分析及染色体分布

高温和高温干旱复合胁迫下水稻花药和授粉雌蕊中的 47 个敏感基因的表达及注释见表 1。从表 1 可以看出, 这 47 个敏感基因主要由热激蛋白、伴侣蛋白、钙结合蛋白和折叠酶等基因家族组成, 其中, 2 个类钙调蛋白基因 *CML36* 在高温和高温干旱

复合胁迫下的花药中表达上调,但在授粉雌蕊中表达下调,表明这 2 个敏感基因在逆境胁迫下的表达具有组织特异性,但对不同种类胁迫的应答没有特异性;*OMTN4* 在高温胁迫下表达下调,但在高温干旱复合胁迫下表达上调,说明 *OMTN4* 在逆境胁迫下的表达具有胁迫特异性;*RS5* 仅在高温胁迫下的花药中表达下调,在授粉雌蕊中及高温干旱复合胁迫下的花器官中表达均上调;其余 43 个敏感基

因在高温和高温干旱复合胁迫下的水稻花药和授粉雌蕊中表达一致,除 *PSD2* 和 *UMAMIT7* 表达下调外,其他 41 个敏感基因(包括热激蛋白、伴侣蛋白、折叠酶、糖转运蛋白基因等)均上调其表达。染色体分布分析发现,47 个敏感基因在除 10 号染色体外的其他染色体上都有分布,但在 1~6 号染色体具有较高的靶向频率。

表 1 47 个敏感基因在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下的表达

Table 1 The expression of 47 sensitive genes under heat stress and combined heat and drought stress

基因 ID	基因名称	A(H)	A(D+H)	P(H)	P(D+H)	注释
LOC_Os01g04340	<i>HSP16.6</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein
LOC_Os01g04370	<i>HSP16.9A</i>	↑	↑	↑	↑	Class I Heat Shock Protein 1
LOC_Os01g07530	<i>RS5</i>	↓	↑	↑	↑	Galactinol-Sucrose Galactosyltransferase
LOC_Os01g08860	<i>HSP18.0</i>	↑	↑	↑	↑	Class II Small Heat Shock Protein
LOC_Os01g55270	<i>BHT</i>	↑	↑	↑	↑	Calcyclin-Binding Protein
LOC_Os01g67054	<i>CRT3</i>	↑	↑	↑	↑	Calreticulin-3
LOC_Os01g72940	<i>PSD2</i>	↓	↓	↓	↓	Phosphatidylserine Decarboxylase Proenzyme 2
LOC_Os02g08490	<i>CLPB3</i>	↑	↑	↑	↑	Chaperone Protein Clpb3, Mitochondrial
LOC_Os02g15930	<i>BAG 6</i>	↑	↑	↑	↑	Bag Family Molecular Chaperone Regulator 6
LOC_Os02g28980	<i>FKBP62c</i>	↑	↑	↑	↑	Fk506 Binding Protein 62c
LOC_Os02g40900	<i>RBP42</i>	↑	↑	↑	↑	RNA-Binding Protein 42
LOC_Os02g52150	<i>HSP24.1</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein, Mitochondrial
LOC_Os02g54140	<i>HSP18.6</i>	↑	↑	↑	↑	Class III Heat Shock Protein
LOC_Os03g02260	<i>ISC24</i>	↑	↑	↑	↑	Iron-Sulfur Cluster Protein 24
LOC_Os03g04080	—	↑	↑	↑	↑	Conserved Hypothetical Protein
LOC_Os03g11910	<i>HSPA8</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein 8
LOC_Os03g14180	<i>HSP26.7</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein, Chloroplastic
LOC_Os03g15960	<i>HSP17.9</i>	↑	↑	↑	↑	Class I Heat Shock Protein
LOC_Os03g16020	<i>HSP17.4</i>	↑	↑	↑	↑	Class I Heat Shock Protein
LOC_Os03g16030	<i>HSP18.1</i>	↑	↑	↑	↑	Class I Heat Shock Protein
LOC_Os03g16040	<i>HSP17.7</i>	↑	↑	↑	↑	Class I Heat Shock Protein
LOC_Os03g16920	<i>HSP70</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein
LOC_Os03g53400	<i>LIFEGUARD 2</i>	↑	↑	↑	↑	Protein Lifeguard 2
LOC_Os04g01740	<i>HSP82</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein 82
LOC_Os04g05010	<i>CBSX5</i>	↑	↑	↑	↑	CBS Domain Containing Membrane Protein
LOC_Os04g28420	<i>FKBP62b</i>	↑	↑	↑	↑	Fk506 Binding Protein 62b
LOC_Os04g36750	<i>HSP23.2</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein
LOC_Os04g45480	<i>STI1B</i>	↑	↑	↑	↑	Stress-Induced Protein 1B
LOC_Os04g59120	<i>UMAMIT7</i>	↓	↓	↓	↓	Wat1-Related Protein At1g68170
LOC_Os05g03910	<i>RPAP3</i>	↑	↑	↑	↑	RNA Polymerase Ii-Associated Protein 3
LOC_Os05g38530	<i>ctHSP70-1</i>	↑	↑	↑	↑	Cytosolic Heat Shock Protein 70-1
LOC_Os05g44340	<i>CLPB1</i>	↑	↑	↑	↑	Chaperone Protein Clpb1
LOC_Os06g02620	<i>DjA9</i>	↑	↑	↑	↑	Chaperone Protein Dnaj
LOC_Os06g09560	<i>DjC53</i>	↑	↑	↑	↑	Dnaj Homolog Subfamily B Member 6
LOC_Os06g14240	<i>HSP16.0</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein, Peroxisomal
LOC_Os06g39260	<i>UTR3</i>	↑	↑	↑	↑	Udp-Galactose/Udp-Glucose Transporter 3
LOC_Os06g46270	<i>OMTN4</i>	↓	↑	↓	↑	Nac Domain-Containing Protein 21/22
LOC_Os06g46900	<i>HSA32</i>	↑	↑	↑	↑	Protein Heat-Stress-Associated 32
LOC_Os07g36490	—	↑	↑	↑	↑	Glycine-Rich Rna-Binding Protein 4, Mitochondrial
LOC_Os08g39560	—	↑	↑	↑	↑	OTU-Like Cysteine Protease Family Protein
LOC_Os09g27830	<i>PDIL2-3</i>	↑	↑	↑	↑	Protein Disulfide Isomerase-Like 2-3

表 1(续)

基因 ID	基因名称	A(H)	A(D+H)	P(H)	P(D+H)	注释
LOC_Os09g35790	<i>HSFB2c</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Stress Transcription Factor B-2c
LOC_Os11g04560	<i>CML36</i>	↑	↑	↓	↓	Probable Calcium-Binding Protein Cml36
LOC_Os11g05170	–	↑	↑	↑	↑	Conserved Hypothetical Protein
LOC_Os11g13980	<i>HSP21.9</i>	↑	↑	↑	↑	Heat Shock Protein
LOC_Os11g32890	–	↑	↑	↑	↑	Conserved Hypothetical Protein
LOC_Os12g04360	<i>CML36</i>	↑	↑	↓	↓	Probable Calcium-Binding Protein Cml36

A、P、H、D+H 分别代表花药、授粉雌蕊、高温胁迫和高温干旱复合胁迫。

2.3 47 个敏感基因所富集的蛋白结构域

47 个敏感基因的 INTERPRO 蛋白结构域的富集分析结果表明，敏感基因主要富集到 25 个蛋白质结构域(图 2),主要为热休克蛋白(包括 4 个 HSP70 和 13 个小热休克蛋白)、伴侣蛋白(主要是 ClpB 和

DnaJ)、四肽重复、FKBP 型肽脯氨酰顺反异构酶和 EF-hand 蛋白结构域。而类 HSP20 伴侣、小热休克蛋白 HSP20 和 α 晶体蛋白/Hsp20 结构域是富集基因数量较多的结构域，所富集基因数分别为 14、13 和 13。

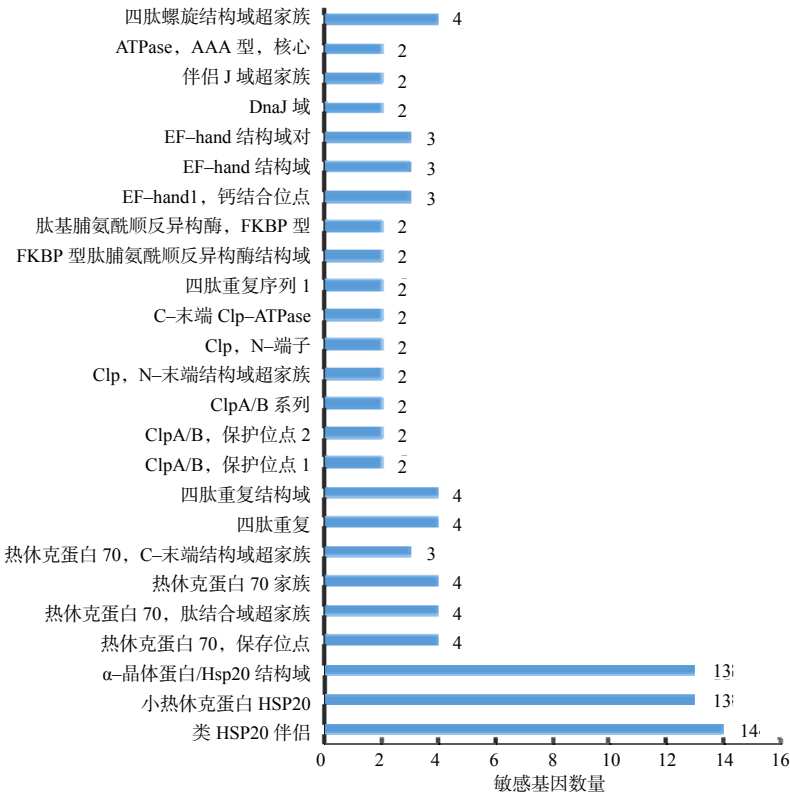


图 2 47 个敏感基因的蛋白质结构域富集分析结果

Fig.2 INTERPRO protein domains enrichment analysis result of 47 sensitive genes

2.4 47 个敏感基因的功能富集分析

47 个敏感基因的功能富集分析结果(图 3) 表明，敏感基因主要富集到 16 个 GO 术语，包括 9 个生物学过程(biological process, BP)和 7 个细胞组分(cellular component, CC)，没有显著富集的分子功能。生物学过程主要富集在对热响应、对压力的反应以及对活性氧的反应等与胁迫密切相关的过

程以及蛋白质折叠；细胞组分主要富集于细胞质、胞内和胞质部分。在 RCTM 途径富集分析中发现，47 个敏感基因主要富集于 8 条代谢途径，其中细胞对压力的反应、类固醇激素受体的 HSP90 伴侣循环以及细胞对热应激的反应是排在前 3 位显著富集的途径，且细胞对压力的反应途径所富集的基因最多(6 个)。此外，敏感基因还显著富集于 HSF1 依赖性转录激活、HSF1 介导的热休克反应调控、蛋白质

甲基化、粒作用和翻译后蛋白质修饰等基本的生物代谢途径和热激响应途径。UP_KEYWORDS 分析共获得了 12 个显著富集的 UP_KEYWORDS 术语,其中应激反应、细胞质和内质网是排在前三位的显著富集的 UP_KEYWORDS 术语;富集基因数最多的是应激反应和螺旋线圈,分别有 17、10 个基因,此外,敏感基因还显著富集于钙、ATP 结合、选择性

拼接、重复、轮状淀粉酶、异构酶、分子伴侣、内质网和 TPR 重复。综合以上情况可知,47 个敏感基因在高温和高温干旱复合胁迫下的花药和授粉雌蕊中主要参与了一些基本的以及与胁迫密切相关的生物学过程和代谢途径,还参与了蛋白质甲基化和类固醇激素受体的 HSP90 伴侣循环。

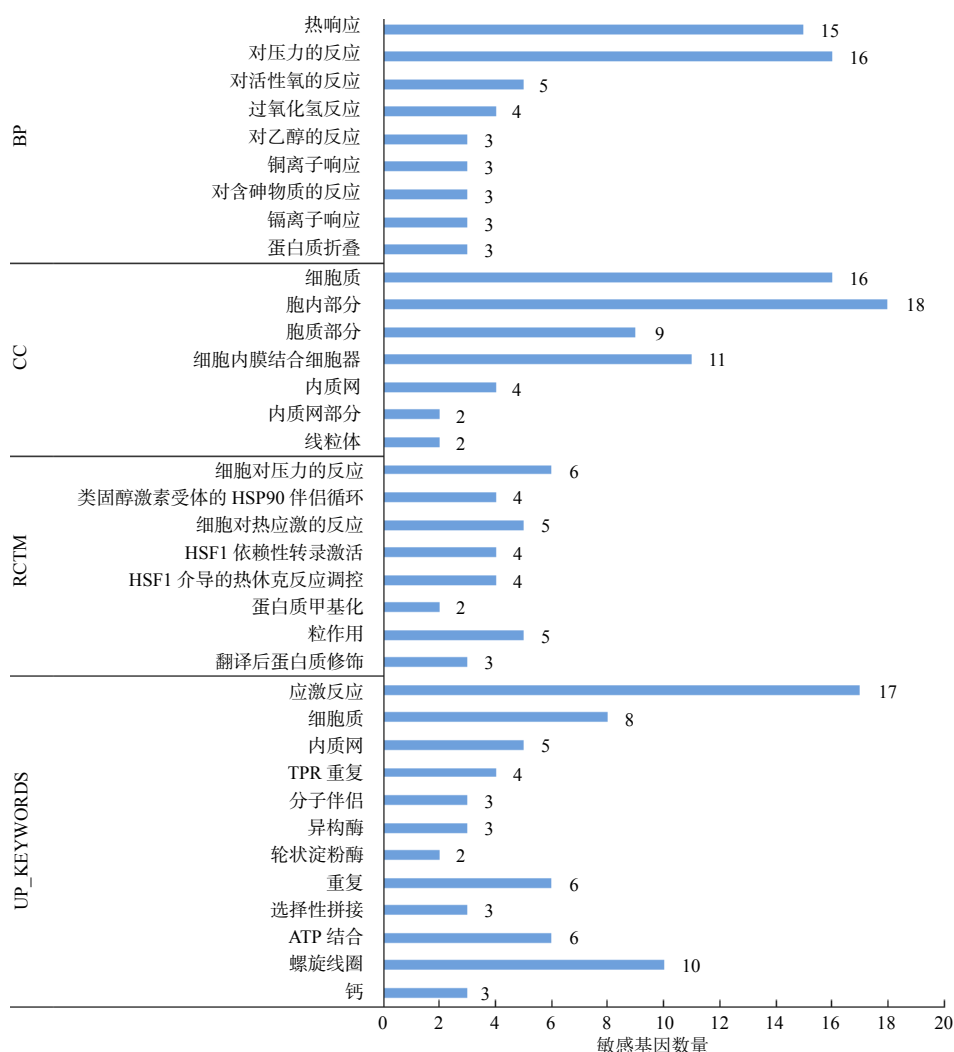


图 3 47 个敏感基因的功能富集分析结果

Fig.3 The functional enrichment analysis result of 47 sensitive genes

2.5 高温、干旱和高温干旱复合胁迫下 DE-miRNAs 鉴定以及 47 个敏感基因的上游 miRNAs 预测

通过文献检索和差异表达分析,分别鉴定出 154、339、22 个在高温、干旱和高温干旱复合胁迫下差异表达的水稻 miRNAs。对 47 个敏感基因的上游 miRNAs 进行预测,获得了 49 个潜在的 miRNAs。将 49 个潜在的 miRNAs 与表 1 中差异表达的

miRNAs 进行对比,发现 49 个潜在的 miRNAs 中有 28 个 miRNAs 在干旱或高温或高温干旱复合胁迫下差异表达,说明这 28 个差异表达的 miRNAs 可能是其对应的 13 个敏感基因的潜在上游 miRNAs(表 2)。已有研究证实 LOC_Os06g46270 (*OMTN4*)是 osa-miR164 的靶基因^[20],说明通过敏感基因的 DNA 序列可预测其可能受哪些 miRNAs 的调控。

表 2 敏感基因的 miRNAs 预测

Table 2 The putative miRNAs of sensitive genes

基因 ID	miRNA	期望值	抑制方式
LOC_Os01g55270	osa-miR1439, osa-miR5162, osa-miR812a, osa-miR812b, osa-miR812c, osa-miR812d, osa-miR812e	2.5	切割
LOC_Os01g55270	osa-miR812s	2.5	翻译抑制
LOC_Os01g72940	osa-miR156k	3.0	切割
LOC_Os02g08490	osa-miR2878-3p	3.0	切割
LOC_Os02g40900	osa-miR5156	3.0	切割
LOC_Os03g11910	osa-miR5498	2.5	切割
LOC_Os04g28420	osa-miR529b	3.0	切割
LOC_Os04g45480	osa-miR812g, osa-miR812h, osa-miR812i, osa-miR812j, osa-miR414	2.5	翻译抑制
LOC_Os05g44340	osa-miR5144-3p	3.0	翻译抑制
LOC_Os06g02620	osa-miR1848	3.0	翻译抑制
LOC_Os06g09560	osa-miR1862e	2.0	切割
LOC_Os06g09560	osa-miR1862f, osa-miR1862g	3.0	翻译抑制
LOC_Os06g46270	osa-miR164a, osa-miR164b, osa-miR164d, osa-miR164f	1.0	切割
LOC_Os08g39560	osa-miR5513	3.0	翻译抑制
LOC_Os12g04360	osa-miR5162	1.5	切割

3 结论与讨论

本研究采用生物信息学手段，从水稻花器官转录组数据中筛选出 47 个在高温胁迫和高温干旱复合胁迫下的花药和授粉雌蕊中均差异表达的敏感基因，并对其表达模式、所富集的蛋白结构域、功能和代谢途径以及可能受哪些上游 miRNAs 的调控进行了分析。结果表明：热休克蛋白、伴侣蛋白以及折叠酶的表达上调，将有利于水稻花器官对抗胁迫诱导的胞内蛋白损伤，增强水稻抗性。因为热休克蛋白和分子伴侣是逆境胁迫应答的主要功能蛋白^[22]，热休克蛋白能利用其分子伴侣的活性促进变性蛋白正确的重折叠来防止蛋白的沉淀，从而使得细胞能对抗高温诱导的胞内蛋白的损伤；而折叠酶如蛋白质二硫键异构酶(PDIs)在植物氧化还原信号转导和蛋白质折叠中起重要作用。有研究^[23-25]发现，拟南芥中的 *PDIs* 在花中的表达量较高，且逆境胁迫能诱导 *PDI* 表达的迅速上升，以抵御胁迫，增强植物的抗性。高温干旱复合胁迫下，谷类作物花中热休克蛋白和糖转运与积累的调节是决定不同基因型品种耐逆性的关键因素^[26]，糖转运蛋白在糖的运输和积累中起重要作用。本研究中，糖转运蛋白基因 *UTR3* 在 2 种胁迫下的表达上调，说明其可能是逆境胁迫下提高水稻抗性的关键基因。*UMAMIT7* 作为生长素诱导蛋白基因，在水稻不同发育阶段各器官的转录组分析中发现其在灌浆籽

粒、花和花蕾中的表达量最高^[27]。本研究中，*UMAMIT7* 在 2 种胁迫下的花药和授粉雌蕊中的表达下调，说明其可能不利于水稻开花和灌浆。在胁迫条件下具有组织特异性的类钙调蛋白 CML 可能对生殖期水稻育性起关键作用。有研究^[28-29]表明，类钙调蛋白 CML 在调控花粉发育、花粉管生长以及逆境胁迫方面起重要作用，但在 2 种逆境胁迫下对水稻花药和授粉雌蕊的影响还有待进一步研究。有研究^[30-31]表明，*OMTN4* 在高温胁迫和干旱胁迫下的表达水平平均会显著降低，而过表达 *OMTN4* 会降低水稻生殖期的抗旱性。本研究中，*OMTN4* 在高温胁迫下表达下调，但在高温干旱复合胁迫下的表达水平显著提高，说明 *OMTN4* 可能在高温干旱复合胁迫下产生了不同于单独暴露在高温或干旱胁迫下的表达模式，不利于水稻生殖期的耐逆性。

富集分析结果显示，47 个敏感基因主要富集于与胁迫相关的蛋白结构域、生物学过程以及代谢途径。富集的小热休克蛋白(sHSP)是植物抗逆过程中的第一条防线^[32]，而 HSP70 蛋白可增强植物对多种非生物逆境胁迫的抗性^[33]，还可通过调节活性氧的含量来抑制水稻细胞的程序性死亡^[34]。作为 HSP100 和 HSP70 分子伴侣家族成员的 ClpB 和 DnaJ 在对抗高温胁迫等多种逆境过程中起着非常重要的作用^[35-36]。EF-hand 结构域是一种与 Ca²⁺ 结合有关的螺旋-环-螺旋结构，这种结构能通过与

Ca^{2+} 的快速结合或分离, 增强植物对非生物胁迫的耐受性^[37]。四肽重复与伴侣蛋白有特定的相互作用, 且与水稻抗性有关^[38]。FKBP 型肽脯氨酰顺反异构酶在胁迫反应中也起着重要作用^[39]。说明高温胁迫和高温干旱复合胁迫下花药和授粉雌蕊中绝大多数敏感基因的功能都与抗逆相关, 这为进一步深入研究高温干旱胁迫下水稻花器官中关键响应基因的生理功能提供依据。

miRNAs 的生物学功能与其靶基因的功能密切相关。miRNAs 可通过调节靶基因的表达在植物生长发育、激素响应和抗逆等多个方面起至关重要的作用。由于植物 miRNA 对靶基因的识别具有高度保守性, 一般不会超过 4 个碱基的错配, 这为通过逆向思维获得敏感基因可能的上游 miRNAs 提供了可能。结合敏感基因表达分析、富集分析以及上游 miRNAs 的预测结果, 可推断 2 种胁迫条件下, osa-miR5144-3p、osa-miR2878-3p、osa-miR1848、osa-miR1862e/f/g、osa-miR529b 和 osa-miR5498 可能在水稻花器官防止蛋白沉淀、促进蛋白正确折叠中起重要的作用; 而 osa-miR164、osa-miR156 和 osa-miR5162 则可能在水稻生殖期间对水稻育性、抽穗、衰老以及磷脂代谢中起关键作用, 但这些 miRNAs 对水稻花器官的具体影响还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] KONDAMUDI R, SWAMY K N, CHAKRAVARTHY D V N, et al. Heat stress in rice-physiological mechanisms and adaptation strategies[M]//VENKATESWARLU B, SHANKER A, SHANKER C, et al. Crop stress and its management: perspectives and strategies. Dordrecht: Springer, 2012: 193–224.
- [2] RIZHSKY L, LIANG H J, MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J]. Plant Physiology, 2002, 130(3): 1143–1151.
- [3] RIZHSKY L, LIANG H J, SHUMAN J, et al. When defense pathways collide. the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1683–1696.
- [4] JAGADISH S V K, MUTHURAJAN R, RANG Z W, et al. Spikelet proteomic response to combined water deficit and heat stress in rice (*Oryza sativa* cv. N₂₂)[J]. Rice, 2011, 4: 1–11.
- [5] RANG Z W, JAGADISH S V K, ZHOU Q M, et al. Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice[J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 70(1): 58–65.
- [6] 张桂莲, 陈立云, 张顺堂, 等. 高温胁迫对水稻花器官和产量构成要素及稻米品质的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(2): 132–136.
- [7] 张桂莲, 张顺堂, 肖浪涛, 等. 花期高温胁迫对水稻花药生理特性及花粉性状的影响[J]. 作物学报, 2013, 39(1): 177–183.
- [8] 黄福灯, 曹珍珍, 李春寿, 等. 花期高温对水稻花器官性状和结实的影响[J]. 核农学报, 2016, 30 (3): 565–570.
- [9] 张顺堂. 高温胁迫对水稻开花受精及稻米品质的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [10] LAWAS L M F, SHI W J, YOSHIMOTO M, et al. Combined drought and heat stress impact during flowering and grain filling in contrasting rice cultivars grown under field conditions[J]. Field Crops Research, 2018, 229: 66–77.
- [11] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [12] LIU Q, YANG T F, YU T, et al. Integrating small RNA sequencing with QTL mapping for identification of miRNAs and their target genes associated with heat tolerance at the flowering stage in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 43.
- [13] LI X, LAWAS L M F, MALO R, et al. Metabolic and transcriptomic signatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress[J]. Plant, Cell & Environment, 2015, 38(10): 2171–2192.
- [14] GONZÁLEZ-SCHAIN N, DRENI L, LAWAS L M F, et al. Genome-wide transcriptome analysis during anthesis reveals new insights into the molecular basis of heat stress responses in tolerant and sensitive rice varieties[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(1): 57–68.
- [15] LI J, WU L Q, ZHENG W Y, et al. Genome-wide identification of MicroRNAs responsive to high temperature in rice (*Oryza sativa*) by high-throughput deep sequencing[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2015, 201(5): 379–388.
- [16] MANGRAUTHIA S K, BHOGIREDDY S, AGARWAL S, et al. Genome-wide changes in microRNA expression during short and prolonged heat stress and recovery in contrasting rice cultivars[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(9): 2399–2412.
- [17] BALYAN S, KUMAR M, MUTUM R D, et al. Identification of miRNA-mediated drought responsive multi-tiered regulatory network in drought tolerant rice,

- Nagina 22[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 15446.
- [18] KANSAL S, DEVI R M, BALYAN S C, et al. Unique miRNome during anthesis in drought-tolerant indica rice var. Nagina 22[J]. Planta, 2015, 241: 1543–1559.
- [19] 李钰. 高温干旱复合胁迫下水稻的应答响应[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [20] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue): D447–D452.
- [21] DAI X B, ZHUANG Z H, ZHAO P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server(2017 release)[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W49–W54.
- [22] WANG W X, VINOCUR B, SHOSEYOV O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 244–252.
- [23] LU D P, CHRISTOPHER D A. Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280: 199–210.
- [24] SWEETLOVE L J, HEAZLEWOOD J L, HERALD V, et al. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria[J]. The Plant Journal, 2002, 32(6): 891–904.
- [25] LIU Y H, WANG X T, SHI Y S, et al. Expression and characterization of a protein disulfide isomerases in maize (*Zea mays* L.)[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(3): 229–234.
- [26] LAWAS L M F, ZUTHER E, JAGADISH S K, et al. Molecular mechanisms of combined heat and drought stress resilience in cereals[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45: 212–217.
- [27] WANG H, NIU Q W, WU H W, et al. Analysis of non-coding transcriptome in rice and maize uncovers roles of conserved lncRNAs associated with agriculture traits[J]. The Plant Journal, 2015, 84(2): 404–416.
- [28] 于晓俊, 曹绍玉, 董玉梅, 等. 钙结合蛋白对花粉生长发育调控研究进展[J]. 西北植物学报, 2016, 36(10): 2121–2127.
- [29] 曾后清, 张夏俊, 张亚仙, 等. 植物类钙调素生理功能的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(6): 705–715.
- [30] FANG Y J, XIE K B, XIONG L Z. Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(8): 2119–2135.
- [31] PENG Y, ZHANG X W, LIU Y W, et al. Exploring heat-response mechanisms of microRNAs based on microarray data of rice post-meiosis panicle[J]. International Journal of Genomics, 2020, 2020: 7582612.
- [32] SUN W N, VAN MONTAGU M, VERBRUGGEN N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1577(1): 1–9.
- [33] MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA R E, et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(8): 659–665.
- [34] QI Y C, WANG H J, ZOU Y, et al. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice[J]. FEBS Letters, 2011, 585(1): 231–239.
- [35] SINGH A, SINGH U, MITTAL D, et al. Genome-wide analysis of rice ClpB/HSP100, ClpC and ClpD genes[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 1–18.
- [36] 张大栋, 周春霖, 任丽娟, 等. 海蓬子 DnaJ-like 基因片段的表达和生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(3): 222–224.
- [37] CAO Y B, ZHANG M, LIANG X Y, et al. Natural variation of an EF-hand Ca^{2+} -binding-protein coding gene confers saline-alkaline tolerance in maize[J]. Nature Communications, 2020, 11: 186.
- [38] YANG C, YU Y Q, HUANG J K, et al. Binding of the *Magnaporthe oryzae* chitinase MoChial by a rice tetratricopeptide repeat protein allows free chitin to trigger immune responses[J]. The Plant Cell, 2019, 31(1): 172–188.
- [39] GOLLAN P J, BHAVE M. Genome-wide analysis of genes encoding FK506-binding proteins in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(1/2): 1–16.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正