

研究报告

miRNA 响应印度梨形孢定殖调控大麦生长发育的作用机制

章延泽[#], 袁志[#], 韦陆百合, 李亮^{*}

河北工业大学化工学院, 天津 300130

章延泽, 袁志, 韦陆百合, 李亮. miRNA 响应印度梨形孢定殖调控大麦生长发育的作用机制[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3912-3927.

ZHANG Yanze, YUAN Zhi, WEI Lubaihe, LI Liang. Role of miRNA in the promotion of barley growth by *Piriformospora indica*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3912-3927.

摘要:【背景】内生真菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*)定殖植物可以显著促进植物生长发育。miRNA 已被证实在植物体的生长发育中具有调控作用。【目的】揭示印度梨形孢定殖大麦促进大麦生长发育过程中 miRNA 对印度梨形孢定殖的响应及对大麦生长发育的调控作用。【方法】提取大麦总 RNA, 实施转录组测序并进行序列比对与数据挖掘; 使用高效液相色谱检测大麦生长素等激素水平变化。【结果】印度梨形孢对大麦有显著促生作用; 全转录组测序结果显示: 印度梨形孢侵染 3 d 较空白对照有 18 个差异表达的 miRNA, 其中 11 个 miRNA 上调、7 个 miRNA 下调; 侵染 7 d 与空白对照相比 24 个差异表达的 miRNA, 其中 11 个 miRNA 上调、13 个 miRNA 下调; 侵染 3 d 与侵染 7 d 相比有 3 个 miRNA 上调、6 个 miRNA 下调。GO 功能富集分析与 KEGG 通路分析显示, 差异表达 miRNA 的靶基因主要参与转录、细胞分裂、生长素信号的感知和转导、光合作用和激素刺激响应。靶基因所参与的途径与大麦生长发育密切相关, 暗示 miRNA 对印度梨形孢定殖过程做出了积极响应。代谢产物分析表明 miRNA 参与的调控路径的代谢产物发生改变。【结论】本研究以 miRNA 为入手点, 探究了 miRNA 对大麦生长发育的调控机制, 为揭示印度梨形孢的促生机制提供了新的研究方向。

关键词: miRNA; 转录组测序; 印度梨形孢; 大麦; 调节机制

资助项目: 国家自然科学基金(31801948); 河北省省级科技计划(19226505D); 河北省自然科学基金(C2021202005)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801948), the Hebei Provincial Science and Technology Program (19226505D), and the Hebei Provincial Natural Science Foundation (C2021202005).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: liangli@hebut.edu.cn

Received: 2022-11-28; Accepted: 2022-12-23; Published online: 2023-01-31

Role of miRNA in the promotion of barley growth by *Piriformospora indica*

ZHANG Yanze[#], YUAN Zhi[#], WEI Lubaihe, LI Liang^{*}

College of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

Abstract: [Background] The endophytic fungus *Piriformospora indica* colonizes plants and significantly promotes plant growth and development. miRNAs have been demonstrated to play a regulatory role in plant growth and development. [Objective] To reveal the response of miRNA to *P. indica* colonization and its regulatory role in the growth and development of barley. [Methods] After extraction of total barley RNA, high-throughput sequencing was performed, followed by sequence alignment and data mining. Then, qPCR was conducted to determine the levels of miRNA and target gene expression. High performance liquid chromatography was employed to measure the levels of growth hormones in barley. [Results] *P. indica* significantly promoted the growth of barley. The whole transcriptome sequencing results showed that the barley infected by *P. indica* for three days had 11 miRNAs up-regulated and 7 miRNAs down-regulated compared with the blank control group; the barley infected by *P. indica* for seven days had 11 miRNAs up-regulated and 13 miRNAs down-regulated compared with the blank control group; the barley infected by *P. indica* for seven days had 3 miRNAs up-regulated and 6 miRNAs down-regulated compared with the barley infected by *P. indica* for three days. The GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis showed that predicted target genes of these differentially expressed miRNAs were mainly involved in transcription, cell division, auxin signal perception and transduction, photosynthesis, and response to hormone stimulus. These pathways were associated with barley growth, which suggested that miRNAs responded positively to the colonization of *P. indica*. In addition, the metabolites of the regulatory pathways involving the differentially expressed miRNAs changed. [Conclusion] This study explored the regulatory role of miRNA in barley growth and development, providing a new research direction for deciphering the growth promotion mechanism of *P. indica* colonization.

Keywords: miRNA; transcriptome sequencing; *Piriformospora indica*; barley; regulatory mechanism

植物细胞中除信使 RNA (mRNA) 外, 还含有多种类型的非编码 RNA, 如 microRNA (miRNA)、circle RNA (circRNA) 等^[1]。miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它们在动植物生长发育过程中参与了广泛的转录后基因表达调控。其调控方式

可分为 3 类: (1) 切断靶基因的 mRNA 分子, 即 miRNA 与靶基因完全互补结合, 最后切割靶 mRNA; (2) 抑制靶基因的翻译, 即 miRNA 与靶基因作用时不完全互补结合, 进而阻遏翻译而不影响 mRNA 的稳定性; (3) 结合抑制, 即当 miRNA 与靶基因互补结合时, 直接靶向切割

mRNA, 当 miRNA 与靶基因不完全结合时, 起调节基因表达的作用^[2-3]。

随着高通量测序的不断发展, 对于 miRNA 的调控机理有了更深入的认识。为了研究 miRNA 是否调控水稻对纹枯病菌的抗性, Cao 等构建了接种后 5、10 和 20 h 的水稻病原菌处理的感、抗纹枯病水稻品种的 12 个小 RNA 文库^[4], 利用二代测序的优势, 从文库中共收集到 400–450 个已知 miRNA 和 450–620 个新 miRNA, miRNA 的表达分析显示了已知和新的 miRNA 在应对病原菌 *Rhizoctonia solani* 的不同表达模式, 鉴定到 34 个 miRNA 家族在水稻中特异表达, 其中大部分参与植物抗病反应。KEGG 通路分析结果表明, 受调控的 miRNAs 的靶基因绝大多数属于植物-病原菌互作通路。此外, 通过 Northern blotting 证实, miR444b.2、miR531a、miR1861i、novel_miR1956 和 novel_miR135 对 *R. solani* 的侵染有响应; 该研究进一步证明 miRNA 通过结合抑制 mRNA 调节基因表达, miRNA 定位于细胞质、细胞核及在细胞外环境的不同细胞室中, miRNA 的亚细胞定位对于促进蛋白质和 RNA 相互作用至关重要, 并最终决定 miRNA 对靶基因的作用方式^[5]。根据目前的研究, miRNA 可以介导靶基因 mRNA 的剪切过程或者与 mRNA 特异结合抑制翻译过程^[6]。这些过程实现了 miRNA 对靶基因转录后的负调控, 在调节生物体的蛋白质翻译过程中起到重要作用。

内生真菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*) 于 1998 年由印度科学家 Varma 等从印度西北部地区塔尔沙漠的灌木根际分离 *Glomus mosseae* 孢子时所得, 由于其厚垣孢子呈梨形, 因此被称为梨形孢^[7]。印度梨形孢可在诸多重要农业经济作物、观赏植物及药用作物根部定殖^[8], 并能广泛促进营养物质和生物活性物质积累^[9]、增强抗生物及非生物胁迫等多种功能^[10]。前人

的研究一方面侧重于印度梨形孢对植物的促生作用^[11], 另一方面考察其提高植物抗各种逆境胁迫包括非生物胁迫(如盐胁迫^[12-14], 干旱胁迫^[15], 砷胁迫^[16], 水分胁迫^[17-18])及生物胁迫^[19-20]等方面的内容, 还未见有大麦与内生真菌互作过程中 miRNA 的调控作用研究。

本研究应用分子生物学与生物信息技术研究和探索 miRNA 在印度梨形孢促进大麦生长发育中的调节机制, 对 miRNA 的调控作用进行深入的探索, 以期开拓 miRNA 调控作用下印度梨形孢促生机制研究的新方向和新思路。

1 材料与方法

1.1 样品

印度梨形孢(*P. indica*)菌株由德国吉森大学植物病理研究所(Institute of Pathology and Applied Zoology, IPAZ, Giessen) Karl Heinz Kogel 教授惠赠。大麦(*Hordeum vulgare*)为天津农科院惠赠, 品种为津农 8 号。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

印度梨形孢的培养采用 CM 培养基^[21]。大麦无菌培养采用 MS 培养基^[22]。Revert-Aid 第 1 链 cDNA 合成试剂盒、Qubit RNA 分析试剂盒、Ribo-Zero RNA Removal Kit, 天津鼎国生物技术有限公司; NEB Next RULtra™ RNA Library Prep Kit, 上海拜力生物技术有限公司。Agilent 2100 生物分析仪, 北京龙跃科技发展有限公司; NanoPhotometer 分光光度计, 广州东锐科技有限公司。

1.3 植株的培养与样品制备

将春大麦品种‘福大麦 1 号’用 70%乙醇表面消毒 3 min, 然后在次氯酸钠(5%活性氯)中杀菌 20 min。经过消毒处理后在培养皿中培养, 加蒸馏水浸湿, 黑暗 25 °C 培养, 发芽后种植于蛭石与珍珠岩体积之比为 2:1 的基质中, 每盆

种 10 颗种子。待大麦种苗转入基质 5 d 后, 进行印度梨形孢孢子液侵染。每株幼苗用注射器注入 10 mL 浓度为(1×10^5 个/mL)的孢子悬液, 每天 2 次。对照加入相同剂量清水。将大麦分为 3 组: Mock: 对照组; 印度梨形孢侵染 3 d 组(3 days after inoculation, 3 dai); 印度梨形孢侵染后 7 d 组(7 dai), 每组 3 个重复。培养结束后, 对这 9 组样本的大麦根部进行取样, 每个样本采集 6 株送往天津诺禾致源生物信息科技有限公司进行 miRNA 建库测序。

1.4 大麦根部植物激素的测定

采用高效液相色谱分析测定植物激素含量, 包括生长素(auxin, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA3)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和水杨酸(salicylic acid, SA)这 4 种激素, 具体方法参考文献[23]。

1.5 RNA 提取文库的构建

用 TRIzol 法提取对照组与处理组的大麦根部样本中 RNA, 并进行序列测定。纯化的 RNA 用 Revert-Aid 第 1 链 cDNA 合成试剂盒进行反转录。反转录引物使用 oligo dT, 反转录程序: 70 °C 10 min; 42 °C 45 min; 70 °C 10 min, 停止反应。使用 Agilent 2100 生物分析仪评估 RNA 质量和完整性。分别使用 NanoPhotometer 分光光度计和 Qubit2.0 Fluorometer 中的 Qubit RNA 分析试剂盒检查 RNA 纯度与浓度。使用 Ribo-Zero RNA Removal Kit (Epicentre Biotechnologies)和 NEB Next RULtra™ RNA Library Prep Kit 构建 RNA-Seq 文库。根据末端配对法, 使用 Illumina HiSeq TM2000 对得到的文库进行测序。每个样本进行 3 个生物学重复^[24]。

1.6 差异基因表达分析

使用 R 语言进行基因表达差异分析, 使用校正后的 P 值, 即 P_{adj} , 判断显著性水平。将 P_{adj} 小于 0.05 时作为差异显著性的判断标准。

$P < 0.05$ 则视为差异表达基因^[25]。

1.7 KEGG pathway 富集分析

使用 KEGG 网站[KEGG PATHWAY Database (genome.jp)]进行 Pathway 分析。气泡图使用 R 语言 ggplot2 package 制作。挑选富集最显著的 20 条 pathway 进行展示。当修正 $P < 0.05$ 时视为显著富集。

2 结果与分析

2.1 印度梨形孢的根部促生作用

使用小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)染色法, 可以确定印度梨形孢可以在大麦根部成功定殖, 如图 1A、1B 中被亮绿色染色的部分。印度梨形孢定殖后, 大麦根长相较于未定殖大麦明显伸长, 并且分枝数明显增多(图 1C、1D), 对 100 棵幼苗统计显示: 幼苗根长度相比于对照(Mock 组, 下同)有显著提升(图 1E); 并且大麦根长生物量相比于对照分别提高 27% (定殖后 3 d)和 65% (定殖后 7 d) (图 1F)。以上结果可以证明, 印度梨形孢的定殖对大麦根系生长有显著促进作用。

2.2 差异 RNA 的筛选

为探究 miRNA 介导印度梨形孢定殖促生作用机理, 对于在相同情况下培养的印度梨形孢侵染 3 d 组、印度梨形孢侵染 7 d 组与空白对照组样品进行 RNA-Seq 测序。对上述 3 组样本进行差异 miRNA 对比, 并绘制出火山图(图 2)。可以看出, 3 dai 与 Mock 组对比, 共发现 18 个差异表达的 miRNA, 其中 11 个 miRNA 表现为上调、7 个 miRNA 表现为下调(图 2A)。7 dai 与 Mock 组对比, 共发现 24 个差异表达的 miRNA, 其中 11 个 miRNA 表现为上调、13 个 miRNA 表现为下调(图 2B)。7 dai 与 3 dai 组对比, 共发现 9 个差异表达的 miRNA, 其中 3 个 miRNA 表现为上调、6 个 miRNA 表现为下调(图 2C)。

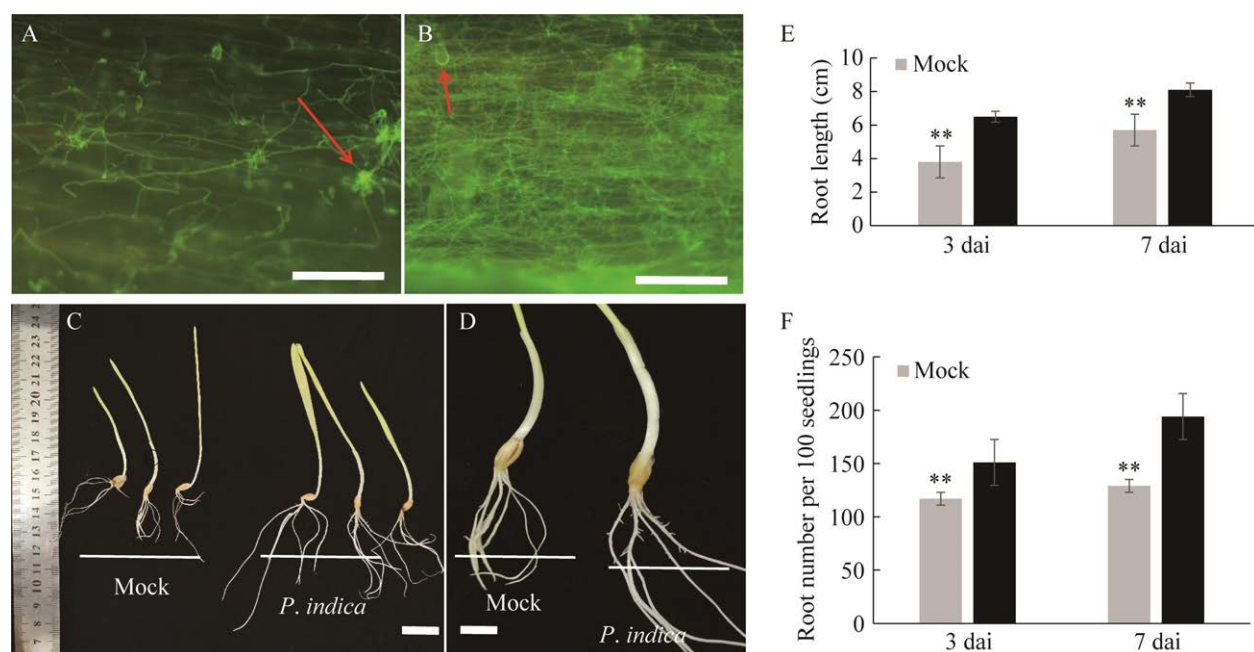


图1 印度梨形孢定殖后大麦生长情况 A: 侵染 3 d, 标尺=30 μm . B: 侵染 7 d, 标尺=30 μm . 荧光显微镜显示 WGA-AF488 染色的印度梨形孢细胞壁(λ_{ex} 494 nm, λ_{em} 515 nm). C: 侵染 3 d 与未侵染大麦长势对比, 标尺=5 cm. D: 侵染 7 d 与未侵染大麦长势对比, 标尺=5 cm. E: 大麦根部长度统计. F: 大麦根部数量统计. **: $P \leq 0.01$

Figure 1 Barley growth after colonization by *Piriformospora indica*. A: Infection for 3 days, scale bar=30 μm . B: Infection for 7 days, scale bar=30 μm . Fluorescence microscopy showing WGA-AF488 stained cell wall of *P. indica* (λ_{ex} 494 nm, λ_{em} 515 nm). C: Infection for 3 days vs. Mock, scale bar=5 cm. D: Infection for 7 days vs. Mock, scale bar=5 cm. E: Barley root length statistics. F: Barley root number statistics. **: $P \leq 0.01$.

2.3 差异 miRNA 编组间对比韦恩图

不同组间的差异 miRNA 韦恩图可以直观地显示差异 miRNA 的数目和不同组间的关系。数据挖掘结果显示在比较 HV_7DAI vs. Mock 组与 HV_3DAI vs. Mock 组中, 发现有 12 个共有 miRNA (图 3A); 在比较 HV_7DAI vs. HV_3DAI 组与 HV_3DAI vs. Mock 组中, 发现有 5 个共有 miRNA (图 3B); 在比较 HV_7DAI vs. HV_3DAI 组与 HV_7DAI vs. Mock 组中, 发现有 5 个共有 miRNA (图 3C)。在 HV_7DAI vs. HV_3DAI 组, HV_7DAI vs. Mock 组与 HV_3DAI vs. Mock 组的比较中, 有 2 个 miRNA 是 3 组共有的(图 3D)。

2.4 miRNA 靶基因富集分析

2.4.1 GO 富集分析

对表达量有差异的 miRNA 所对应的靶基因进行 GO 功能富集分析。对于 3 dai vs. Mock 组(图 4A): 靶基因参与的生物学过程中, 参与细胞生物合成过程的靶基因表达量最高。靶基因参与的分子功能中, 参与转移酶活性的靶基因表达量最高。靶基因参与的细胞成分中, 靶基因表达量都较低。对于 7 dai vs. Mock 组(图 4B): 靶基因参与的生物学过程中, 参与细胞过程的靶基因表达量最高。靶基因参与的分子功能中, 参与细胞器成分的靶基因表达量最高。靶基因参与的细胞成分中, 靶基因表达量都较低。对

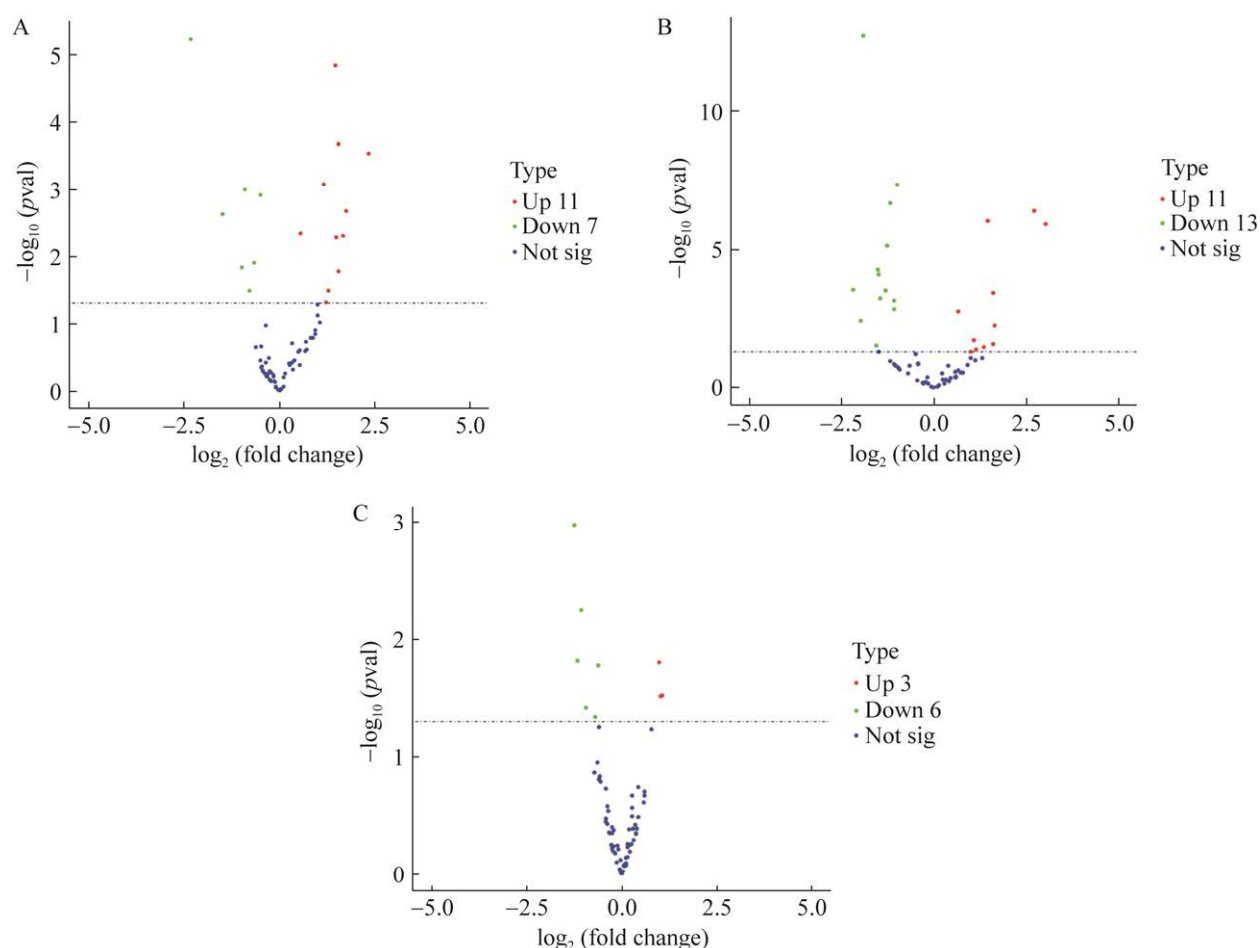


图2 不同组间差异 miRNA 火山图 A: 侵染 3 d 比对照. B: 侵染 7 d 比对照. C: 侵染 7 d 对比侵染 3 d
Figure 2 Differential miRNA volcano plots between different groups. A: Infection for 3 days vs. Mock. B: Infection for 7 days vs. Mock. C: Infection for 7 days vs. infection for 3 days.

于 7 dai vs. 3 dai 组(图 4C)。靶基因参与的生物学过程中, 参与含磷化合物代谢物和磷代谢过程的靶基因表达量最高。靶基因参与的分子功能中, 参与小分子结合的靶基因表达量最高。靶基因参与的细胞成分中, 参与转录因子复合物成分的靶基因表达量最高。

2.4.2 KEGG pathway 富集分析

对印度梨形孢侵染 3 d 对比空白对照组, 印度梨形孢侵染 7 d 对比空白对照组以及印度梨形孢侵染 3 d 对比印度梨形孢侵染 7 d 组的差异表达 miRNA 对应的靶基因功能进行 KEGG

通路富集分析。分析结果如图 5A–5C 所示。这些差异基因所对应的靶基因功能涉及代谢途径(包括糖类以及氨基酸的代谢), 生物合成, ABC 转运等。

对于印度梨形孢侵染 3 d 对比空白对照组(图 5A), 对应靶基因功能涉及辅酶 a 的合成、代谢通路、硫辛酸代谢、调节植物昼夜节律及天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸代谢等。其中代谢通路的显著性水平最高。对于印度梨形孢侵染 7 d 对比空白对照组(图 5B), 对应靶基因功能涉及氨基酸的合成、辅酶 a 的合成、代谢通路等。

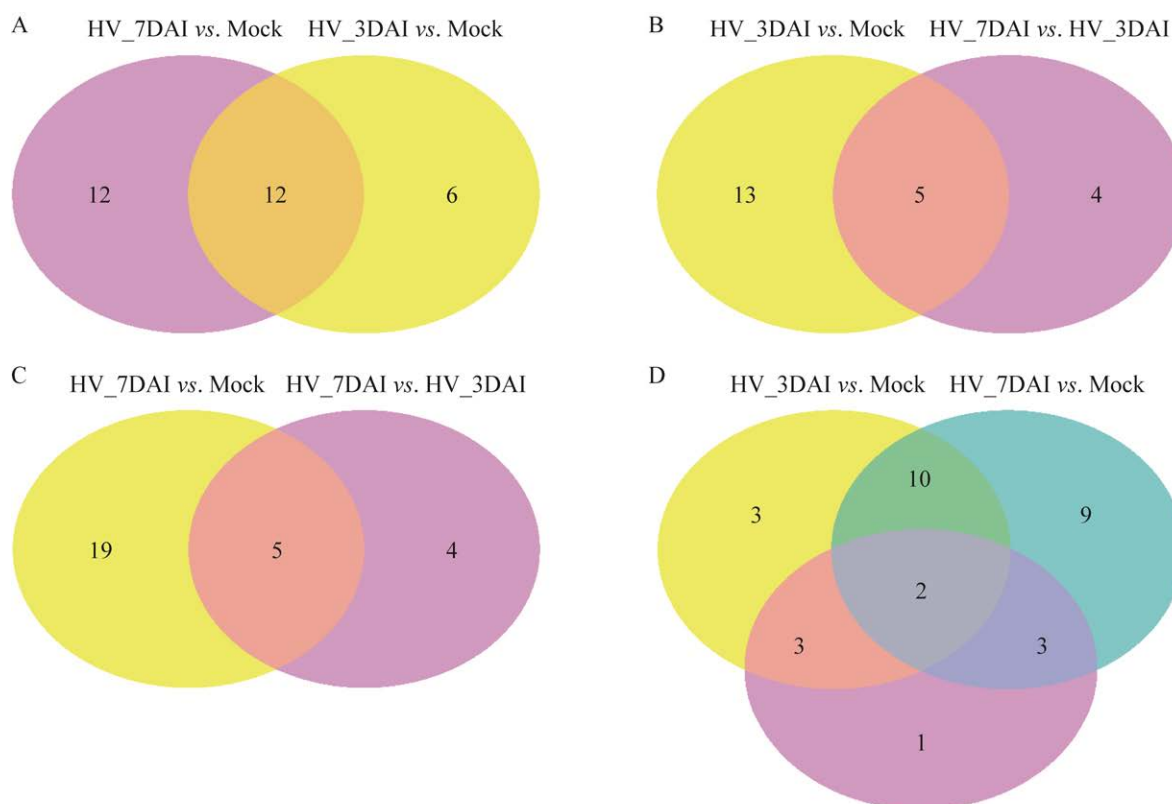


图 3 维恩图显示样本专属或共同存在的内源性 **miRNA** A: 专属或共同存在的内源性 **miRNA** 在感染 7 d 相较对照 vs. 感染 3 d 相较对照组中. B: 专属或共同存在的内源性 **miRNA** 在感染 3 d 相较对照 vs. 感染 7 d 相较感染 3 d 组中. C: 专属或共同存在的内源性 **miRNA** 在感染 7 d 相较对照 vs. 感染 7 d 相较感染 3 d 组中. D: 专属或共同存在的内源性 **miRNA** 在感染 3 d 相较对照 vs. 感染 7 d 相较对照 vs. 感染 7 d 相较感染 3 d 组中

Figure 3 Venn diagrams showing the sample-exclusive or communal presence of unique putative endogenous miRNAs. A: Putative endogenous miRNAs in 7 dai-mock vs. 3 dai-mock. B: miRNAs in 3 dai-mock vs. 7 dai-3 dai. C: miRNAs in 7 dai-mock vs. 7 dai-3 dai. D: miRNAs in 3 dai-mock vs. 7 dai-3 dai vs. 7 dai-mock.

其中代谢通路的显著性水平最高。对于印度梨形孢感染 7 d 对比印度梨形孢感染 3 d 组(图 5C), 对应靶基因功能涉及泛素的生物合成、淀粉和糖类的代谢、RNA 代谢、氨基酸的合成等。其中代谢通路的显著性水平最高。

2.5 miRNA 靶基因功能分析

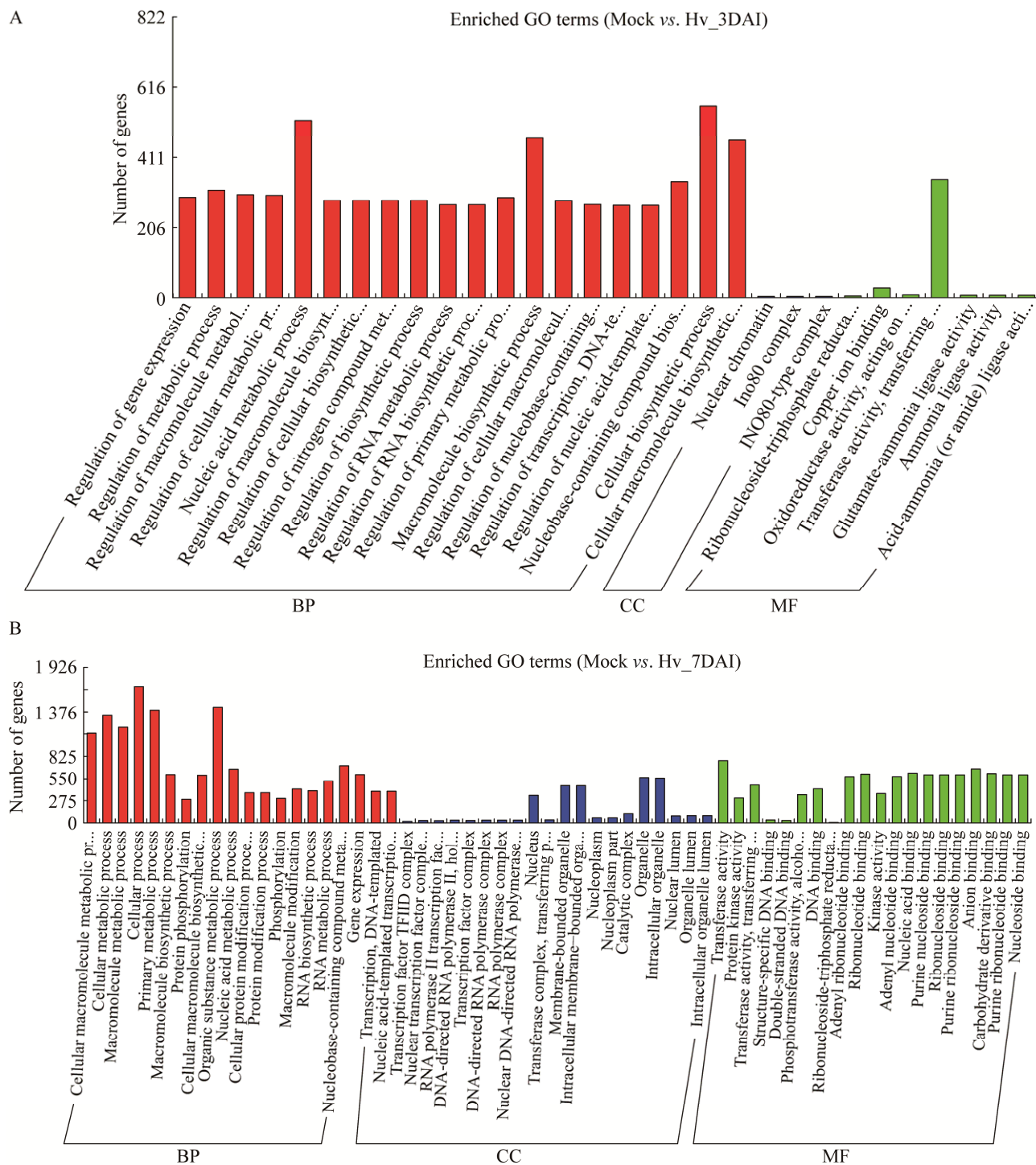
对差异 **miRNA** 的靶基因进行功能分析, 其中 3 dai vs. mock 中发现, 存在 3 个差异的 **miRNA**, 包 hvu-miR6214、hvu-miR444b 和 hvu-miR6190。它们的靶基因所对应的功能包括细胞分裂, 光

合作用以及激素激活途径。在 7 dai vs. mock 组中发现 2 个重要的 **miRNA**, 分别是 hvu-miR6214 和 hvu-miR397a, 其靶基因对应的功能为细胞分裂, 激素激活以及生长素响应。靶基因富集的通路如激素合成途径、细胞分裂途径、光合作用路径都与植物的生长发育有直接作用(表 1)。

利用 KEGG 进一步挖掘关于激素包括 IAA、GA3、ABA、JA 合成途径的关键基因。转录组数据显示生长素合成途径相关基因被上调(图 6), 这些基因是 **miRNA** 包括 hvu-miR397a、

hvu-miR6214、hvu-miR6190 的靶基因, 而 hvu-miR397a、hvu-miR6214、hvu-miR6190 有的表现上调有的表现下调。表明这些 miRNAs 参与了大麦生长素合成途径的靶基因调控过

程。同样地, hvu-miR6190、hvu-miR6189 等 miRNAs 参与了赤霉素合成途径中的抑制因子 DELLA 的调控。DELLA 蛋白表达的降低缓解了赤霉素合成的抑制作用, 这与前期定殖 *P. indica*



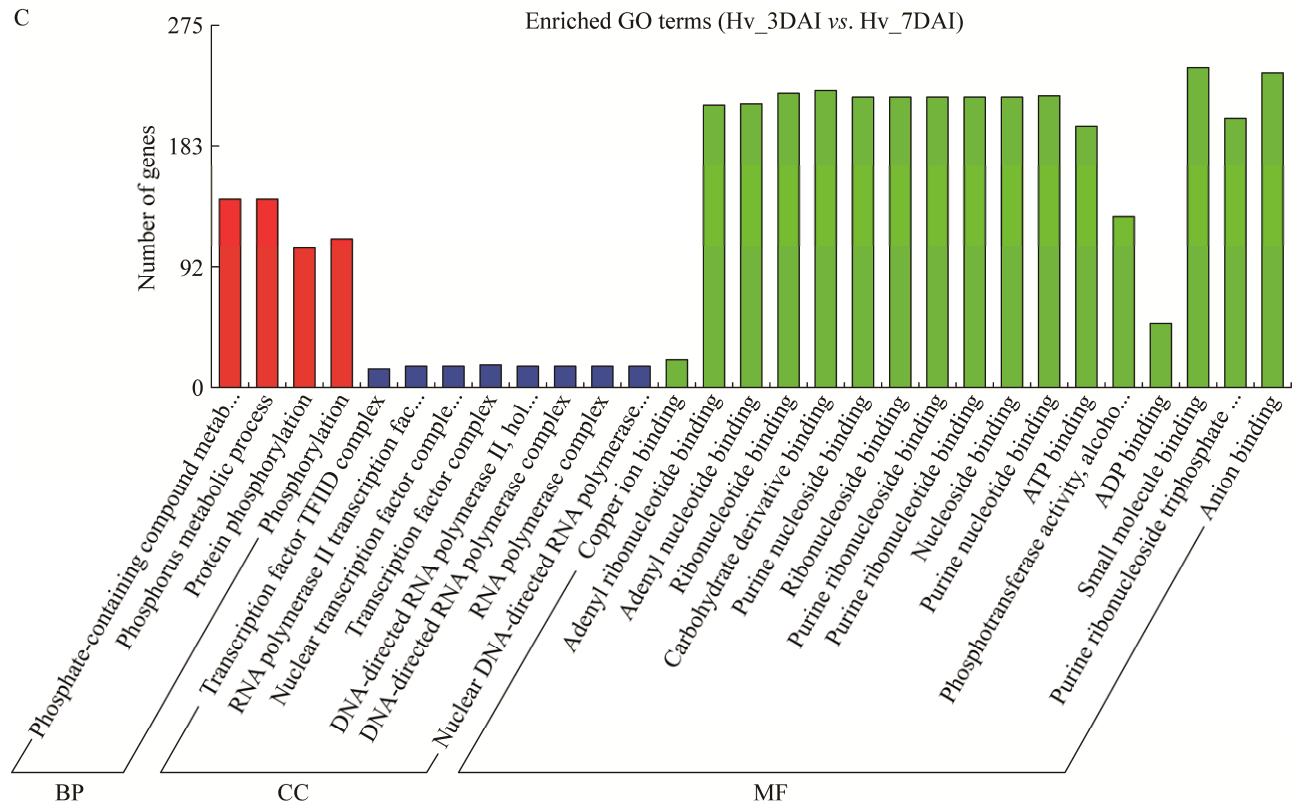
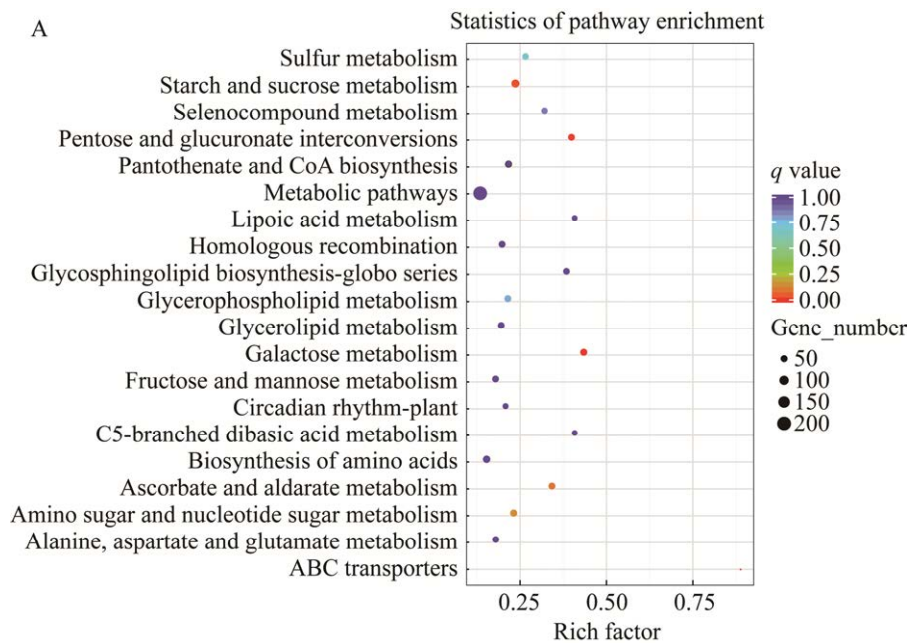


图4 miRNAs 靶基因 GO 功能富集 A: 侵染 3 d 比对照组. B: 侵染 7 d 比对照组. C: 侵染 7 d 比侵染 3 d 组. BP 代表生物学过程, CC 代表细胞成分, MF 代表分子功能

Figure 4 GO functional enrichment of miRNAs target genes. A: 3 dai vs. Mock group. B: 7 dai vs. Mock group. C: 7 dai vs. 3 dai group. BP stands for biological process; CC stands for cellular component; MF stands for molecular function.



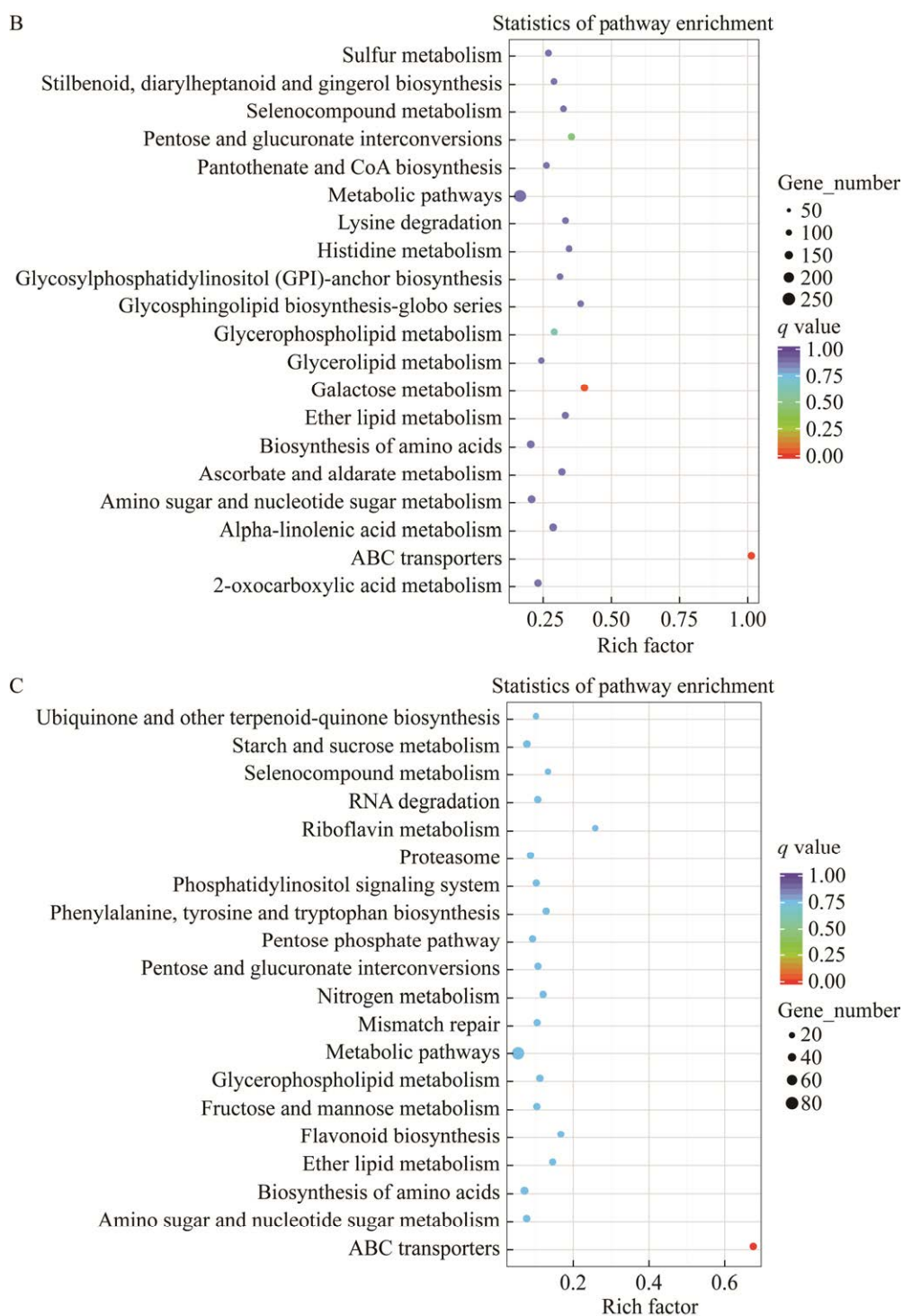


图 5 各比较组中差异 miRNA 靶基因功能 KEGG 富集气泡图 A: 侵染 3 d 比对照组. B: 侵染 7 d 比对照组. C: 侵染 7 d 比侵染 3 d 组

Figure 5 Differential miRNA target gene functional KEGG enrichment map in the respective groups. A: 3 dai vs. Mock group. B: 7 dai vs. Mock group. C: 7 dai vs. 7 dai group.

表 1 miRNA 靶基因功能

Table 1 miRNA target gene functions

	miRNA	Target_gene	P-value	GO term acc. and function description	log ₂ (fold change)
7 dai	hvu-miR6214	HORVU7Hr1G036130	3.094 8×10 ⁻²	GO: 0005179	0.788 87
vs.				hormone activity	
3 dai	hvu-miR6180	HORVU1Hr1G037250	4.847 4×10 ⁻²	GO: 0005179	-1.654 00
				hormone activity	
	hvu-miR6180	HORVU3Hr1G068970	4.847 4×10 ⁻²	GO: 0005184	-1.654 00
				neuropeptide hormone activity	
	hvu-miR6189	HORVU5Hr1G067480	3.070 0×10 ⁻⁷	GO: 0051301	0.948 30
				cell division	
	hvu-miR6189	HORVU4Hr1G036120	3.070 0×10 ⁻⁷	GO: 0009725	0.948 30
				response to hormone	
	hvu-miR6189	HORVU3Hr1G089580	3.070 0×10 ⁻⁷	GO: 0035257	0.948 30
				nuclear hormone receptor binding	
	hvu-miR6189	HORVU1Hr1G095410	3.070 0×10 ⁻⁷	GO: 0015979	0.948 30
				photosynthesis	
	hvu-miR6214	HORVU2Hr1G021110	1.313 6×10 ⁻²	GO: 0051301	-1.413 20
				cell division	
3 dai	hvu-miR6214	HORVU5Hr1G070630	1.313 6×10 ⁻²	GO: 0019684	-1.413 20
vs.				photosynthesis, light reaction	
mock	hvu-miR444b	HORVU5Hr1G092310	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0051301	-2.594 60
				cell division	
	hvu-miR444b	HORVU5Hr1G069040	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0047746	-2.594 60
				chlorophyllase activity	
	hvu-miR444b	ENSRNA049488557	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0007059	-2.594 60
				chromosome segregation	
	hvu-miR444b	HORVU3Hr1G061700	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0005184	-2.594 60
				neuropeptide hormone activity	
	hvu-miR444b	HORVU7Hr1G048310	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0005179	-2.594 60
				hormone activity	
	hvu-miR444b	HORVU2Hr1G090100	5.220 0×10 ⁻⁶	GO: 0015979	-2.594 60
				photosynthesis	
	hvu-miR6190	HORVU7Hr1G040960	4.693 0×10 ⁻²	GO: 0005179	4.597 80
				hormone activity	
	hvu-miR6190	HORVU7Hr1G068230	4.693 0×10 ⁻²	GO: 0005179	4.597 80
				hormone activity	
	hvu-miR6190	HORVU2Hr1G057700	4.693 0×10 ⁻²	GO: 0042548	4.597 80
				regulation of photosynthesis, light reaction	
7 dai	hvu-miR6214	HORVU3Hr1G021610	4.099 4×10 ⁻³	GO: 0051301	-3.977 30
vs.				cell division	
mock	hvu-miR6214	HORVU3Hr1G078090	4.099 4×10 ⁻³	GO: 0005179	-3.977 30
				hormone activity	
	hvu-miR6214	HORVU5Hr1G070630	4.099 4×10 ⁻³	GO: 0005179	-3.977 30
				hormone activity	
	hvu-miR6214	HORVU7Hr1G036130	4.099 4×10 ⁻³	GO: 0005179	-3.977 30
				hormone activity	
	hvu-miR397a	HORVU4Hr1G036120	1.813 1×10 ⁻²	GO: 0009733	-5.244 40
				response to auxin	

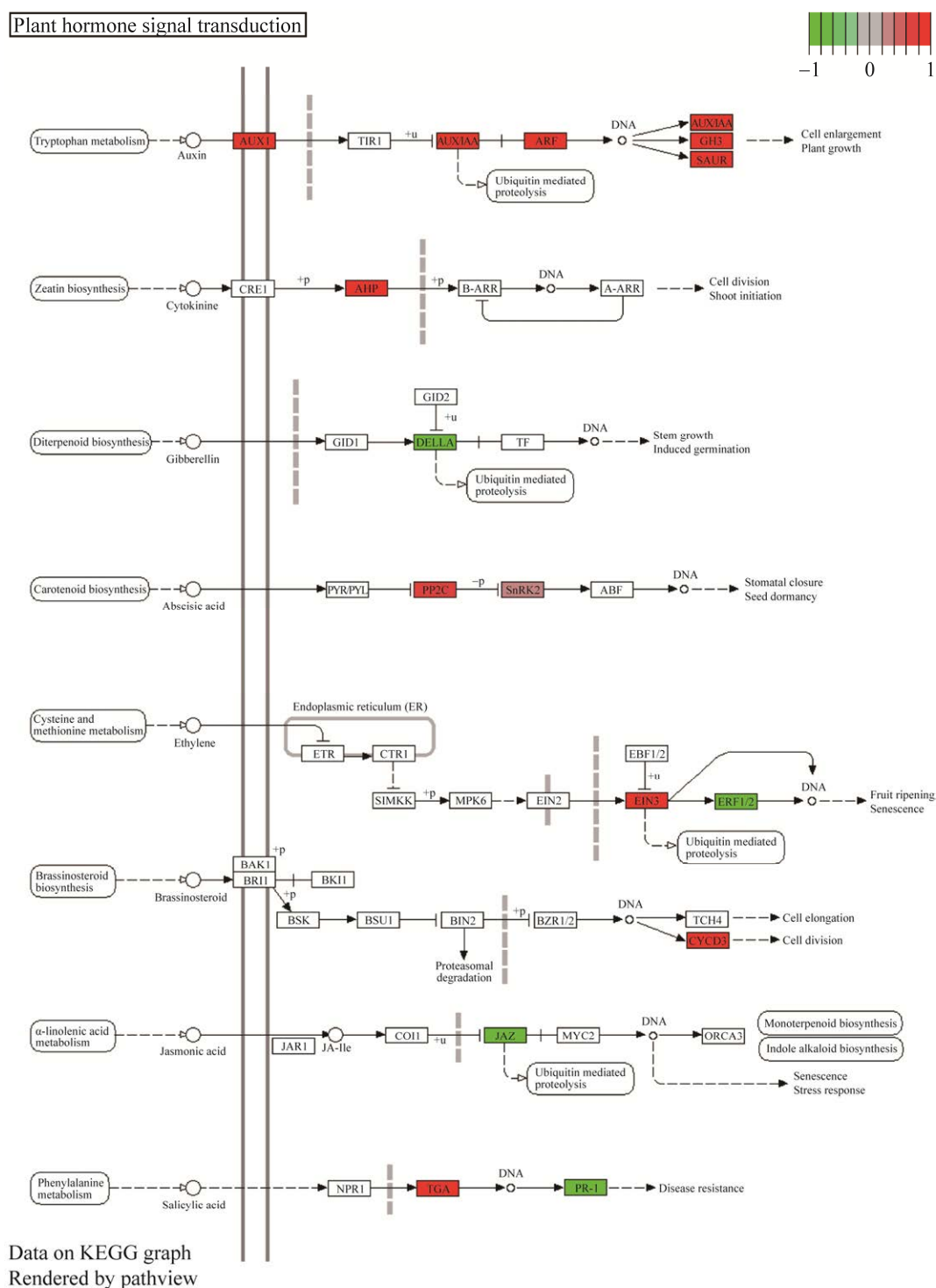


图 6 KEEG 通路分析植物激素信号转导 红色代表激素信号转导通路中上调的 mRNA; 绿色代表激素信号转导通路中下调的 mRNA

Figure 6 Plant hormone signal transduction analyzed by KEEG pathway. Red color stands for the upregulated mRNA in the hormone signal transduction pathway; Green color stands for the down-regulated mRNA in the hormone signal transduction pathway.

促进根系形成和生长的实验结果一致。同时,由图 7 可知,miRNA 的靶基因所参与的其他激素合成路径也受到 *P. indica* 定殖的影响,说明 miRNA 作为靶基因的调控因子,对印度梨形孢的定殖做出了响应。

2.6 印度梨形孢定殖后大麦激素水平检测

由表 1 及图 7 可知,miRNA 对应的靶基因多集中于激素代谢通路,为了验证转录水平的调控作用,我们利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography)对印度梨形孢定殖后,大麦体内的生长素(IAA)、赤霉素(GA3)、脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)这 4 种激素进行了鉴定。实验结果显示印度梨形孢定殖后能显著提高 IAA、GA3 和 ABA 的含量(图 7A–7C)。但 SA

在侵染过程前期(侵染 3 d)比对照组的激素水平低(图 7D),在侵染 7 d 时相比对照组又有提高。

3 讨论与结论

为了应对迅速变化的环境,植物利用多变而又大量的适应机制以及微调的应激反应提供表型的可塑性。分子生物学在研究植物应对生物和非生物胁迫应激通路调节的基因组区域和潜在机制方面取得了巨大进展。在植物中,miRNAs 不断的进化并在调控胁迫反应中发挥重要作用。miRNAs 是大小为 20–22 nt 的非编码 RNA,是植物应对生物和非生物胁迫响应的重要调控分子,是 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的驱动分子^[26]; miRNAs 通过调控靶基因的上

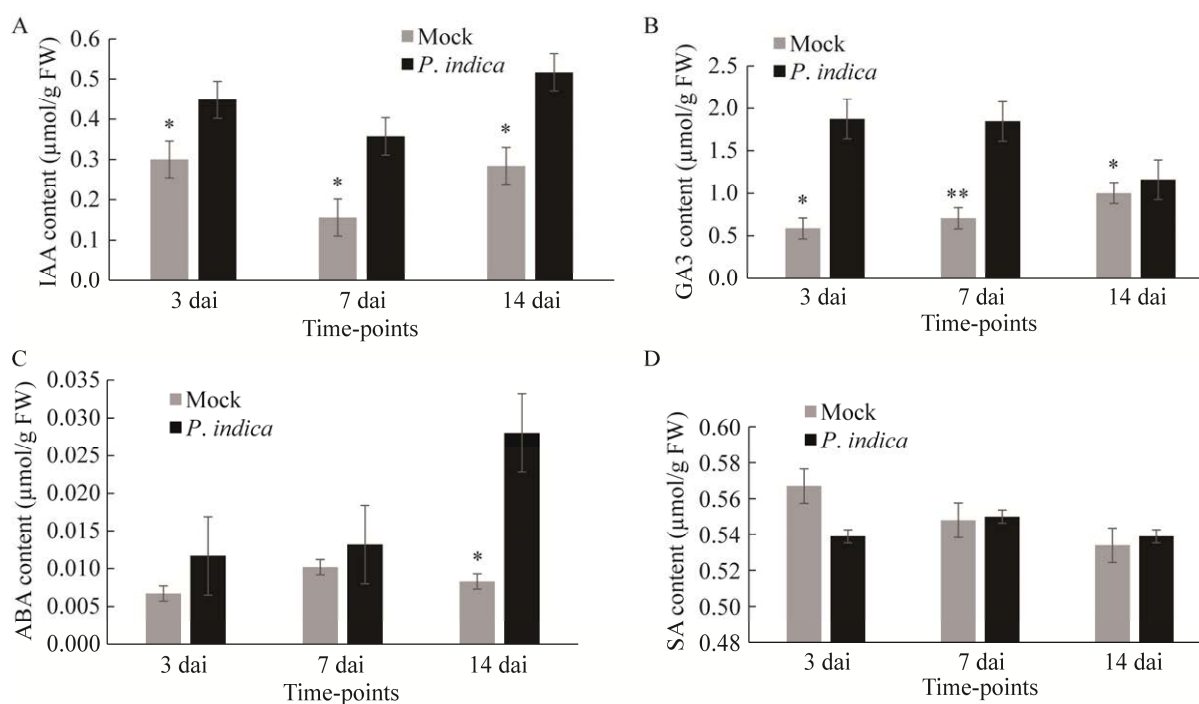


图 7 印度梨形孢定殖对植物激素的影响 A: 印度梨形孢侵染 3、7、14 d 对比未侵染大麦生长素含量. B: 赤霉素含量. C: 脱落酸含量. D: 水杨酸含量

Figure 7 Content of the various hormones detected at different times of colonization by *Piriformospora indica*. A: Content of IAA levels of 3, 7, 14 dai vs. mock. B: Content of GA3 levels. C: Content of ABA levels. D: Content of SA levels. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

调和下调,参与重要的生物过程包括胚胎、分生组织、叶和花^[27]的形成以及对生物和非生物胁迫的响应^[28]。

印度梨形孢定殖植物会产生广泛的促生作用^[29]。植物的生长状况得到明显改善,对于促进植物生长有巨大潜力。然而目前产生这种促生作用的非编码基因调控机理研究较少。在大麦中,miRNAs 对于响应 *P. indica* 定殖从而调控基因表达的作用在很大程度上尚未被探索。有报道显示,印度梨形孢可以诱导文兰根部的生长,并且与相关的 miRNAs 的调控作用有关^[30]。另一项研究表明,*P. indica* 在二穗短柄草^[31]上定殖后,sRNA 发生了转录后重排。本文通过对印度梨形孢定殖不同时间的大麦进行分析测定,发现印度梨形孢的定殖激发了非编码 RNA 的基因调控效应,在 3 个对比组中发现了差异表达的 miRNAs。分析发现在 *P. indica* 定殖过程中有 42 个 miRNAs,其中一些靶基因已知,而另一些靶基因还有待于进一步鉴定。其中 hvu-miR6189、hvu-miR6214、hvu-miR444b、hvu-miR6190、hvu-miR397a 的靶基因实际上具有转录因子活性(表 1)。在拟南芥中,miR165/166 家族对转录因子的抑制可以调节根的生长、茎尖分生组织的维持和叶片极性的发展;mir156 介导的 SPLs 下调可调节发育时间、侧根发育、分枝和叶片形态^[31]。这表明调控转录因子的 miRNAs 在植物生长发育中发挥着重要作用。

实验通过测定植物激素含量包括 IAA、GA3 和 ABA 验证了印度梨形孢定殖对植物激素水平的影响,对转录组进行测序发现有 51 个差异表达的 miRNA。对于这些 miRNA 对应的靶基因的 GO 富集功能分析表明,这些靶基因功能主要集中于激素合成、酶蛋白合成、生长调节因子合成等功能。这也说明 miRNAs 通过调控激素代谢路径的基因表达从而影响植物体

内代谢产物含量。进一步对差异表达的 miRNA 靶基因进行 KEGG 富集分析,结果显示靶基因主要富集在合成与代谢途径上,还有一些基因富集在分子的合成与代谢上。这些基因通过控制植物体代谢与分子合成等方式调节植物体的生长发育。

综上所述,本文挖掘了在印度梨形孢侵染下影响大麦生长的 miRNA,对比不同组别的差异 miRNA 对应的靶基因功能进行比较,初步揭示了 miRNA 调节大麦生长的方式以及印度梨形孢促生作用在分子层面的作用机制。通过 GO 富集与 KEGG Pathway 富集分析,差异表达 miRNA 的靶基因主要参与转录、细胞分裂、生长素信号的感知和转导、光合作用和激素刺激响应等路径,靶基因所参与的途径与大麦生长发育密切相关,暗示 miRNA 对印度梨形孢定殖过程做出了积极响应,这些结果也能为后续探究印度梨形孢促生机制以及 miRNA 如何调控植物生长发育奠定基础。

REFERENCES

- [1] 刘琳营,苏晓俊,闵玲.植物中长链非编码 RNA 研究进展综述[J].江苏农业科学,2021,49(12): 12-19.
LIU LY, SU XJ, MIN L. Research progress of long non-coding RNA in plants: a review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(12): 12-19 (in Chinese).
- [2] BRODERSEN P, SAKVARELIDZE-ACHARD L, BRUUN-RASMUSSEN M, DUNOYER P, YAMAMOTO YY, SIEBURTH L, VOINET O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs[J]. Science, 2008, 320(5880): 1185-1190.
- [3] TRABUCCHI M, MATEGOT R. Subcellular heterogeneity of the microRNA machinery[J]. Trends in Genetics: TIG, 2020, 36(1): 70.
- [4] CAO WL, CAO XX, ZHAO JH, ZHANG ZY, FENG ZM, OUYANG SQ, ZUO SM. Comprehensive characteristics of microRNA expression profile conferring to *Rhizoctonia solani* in rice[J]. Rice Science, 2020, 27(2): 101-112.
- [5] TORMA F, GOMBOS Z, JOKAI M, BERKES I,

- TAKEDA M, MIMURA T, RADAK Z, GYORI F. The roles of microRNA in redox metabolism and exercise-mediated adaptation[J]. Journal of Sport and Health Science, 2020, 9(5): 405-414.
- [6] 张翠桔, 莫蓓莘, 陈雪梅, 崔洁. 植物 miRNA 作用方式的分子机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(7): 1-14.
- ZHANG CJ, MO BX, CHEN XM, CUI J. Advances on the molecular action mechanisms of plant miRNA[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(7): 1-14 (in Chinese).
- [7] VARMA A, BAKSHI M, LOU BG, HARTMANN A, OELMUELLER R. *Piriformospora indica*: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus[J]. Agricultural Research, 2012, 1(2): 117-131.
- [8] YANG L, CAO JL, ZOU YN, WU QS, KUČA K. *Piriformospora indica*: a root endophytic fungus and its roles in plants[J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2020, 48(1): 1-13.
- [9] LI D, BODJRENOU DM, ZHANG ST, WANG B, PAN H, YEH KW, LAI ZX, CHENG CZ. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms banana to cold resistance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4973.
- [10] GHAFARI MR, MIRZAEI M, GHABOOLI M, KHATABI B, WU YQ, ZABET-MOGHADDAM M, MOHAMMADI-NEJAD G, HAYNES PA, HAJIREZAEI MR, SEPEHRI M, SALEKDEH GH. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* improves drought stress adaptation in barley by metabolic and proteomic reprogramming[J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 157: 197-210.
- [11] TSAI HJ, SHAO KH, CHAN MT, CHENG CP, YEH KW, OELMUELLER R, WANG SJ. *Piriformospora indica* symbiosis improves water stress tolerance of rice through regulating stomata behavior and ROS scavenging systems[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, 15(2): 1722447.
- [12] BOORBOORI MR, ZHANG HY. The role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in improving plant resistance to drought and salinity stresses[J]. Biology, 2022, 11(7): 952.
- [13] XU ZW, PEHLIVAN N, GHORBANI A, WU C. Effects of *Azorhizobium caulinodans* and *Piriformospora indica* Co-inoculation on growth and fruit quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under salt stress[J]. Horticulturae, 2022, 8(4): 302.
- [14] ABO NOUH FA, ABO NAHAS HH, ABDEL-AZEEM AM. *Piriformospora indica*: endophytic fungus for salt stress tolerance and disease resistance[M]//Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing, 2020: 261-283.
- [15] SWETHA S, PADMAVATHI T. Mitigation of drought stress by *Piriformospora indica* in *Solanum melongena* L. cultivars[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2020, 90(3): 585-593.
- [16] RAHMAN SU, KHALID M, KAYANI SI, TANG KX. The ameliorative effects of exogenous inoculation of *Piriformospora indica* on molecular, biochemical and physiological parameters of *Artemisia annua* L. under arsenic stress condition[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 206: 111202.
- [17] HU LS, HE XR, WEI PJ, SUN B, FEI YJ, HU D. Effects of *Piriformospora indica* on the respiration of *Taxus chinensis* var. *mairei* under water stress[J]. Phytom, 2021, 90(6): 1661-1672.
- [18] ABDELAZIZ ME, ATIA MAM, ABDELSATTAR M, ABDELAZIZ SM, IBRAHIM TAA, ABDELDAYM EA. Unravelling the role of *Piriformospora indica* in combating water deficiency by modulating physiological performance and chlorophyll metabolism-related genes in *Cucumis sativus*[J]. Horticulturae, 2021, 7(10): 399.
- [19] WU H, WANG B, HAO XY, ZHANG YY, WANG TC, LU ZH, LAI ZX, CHENG CZ. *Piriformospora indica* promotes the growth and enhances the root rot disease resistance of gerbera[J]. Scientia Horticulturae, 2022, 297: 110946.
- [20] PANDA S, BUSATTO N, HUSSAIN K, KAMBLE A. *Piriformospora indica*-primed transcriptional reprogramming induces defense response against early blight in tomato[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 255: 209-219.
- [21] 舒珊, 高中南, 袁昕, 陈强, 朱志炎, 何勇, 叶开温, 田志宏. 印度梨形孢最适培养基的筛选及其对水稻的促生作用研究[J]. 福建农业学报, 2019, 34(2): 155-161.
- SHU S, GAO ZN, YUAN T, CHEN Q, ZHU ZY, HE Y, YE KW, TIAN ZH. Optimized culture medium and effect of *Piriformospora indica* on growth of rice plants[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 34(2): 155-161 (in Chinese).
- [22] 蔡祖国, 李桂荣, 姜立娜, 陈学进, 周俊国. MS 培养基配方研究[J]. 现代农业科技, 2022(8): 125-127.
- CAI ZG, LI GR, JIANG LN, CHEN XJ, ZHOU JG.

- Study on the formulation of MS medium[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2022(8): 125-127 (in Chinese).
- [23] 邱雄雄, 钟启升, 詹松, 黄涛宏, 端裕树. 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定烟草中的六种植物激素[C]//第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集(第三分册). 西安, 2015: 90.
- QIU XX, ZHONG QS, ZHAN S, HUANG TH, DUAN YS. Determination of six phytohormones in tobacco by ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry[C]//Proceedings of the Twentieth National Chromatography Symposium and Instrument Exhibition (3rd fascicle). Xi'an, 2015: 90 (in Chinese).
- [24] 李杨, 李海娜, 夏颖, 刘忻壑, 李艳茹, 许广波. 适合于全长 cDNA 文库构建的猪苓菌核及菌丝体总 RNA 提取方法比较[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(2): 63-65, 77.
- LI Y, LI HN, XIA Y, LIU XH, LI YR, XU GB. Comparison of methods for extracting total RNA from *Polyporus umbellatus* Mycelium and *Sclerotium suitable* for constructing full-length cDNA library[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(2): 63-65, 77 (in Chinese).
- [25] 李城. 印度梨形孢提高西瓜养分利用及产量的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
- LI C. Mechanism of improving nutrient utilization and yield of watermelon by *Piriformospora indica*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [26] ALKAN AH, AKGÜL B. Endogenous miRNA sponges[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2022, 2257: 91-104.
- [27] D'ARIO M, GRIFFITHS-JONES S, KIM M. Small RNAs: big impact on plant development[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(12): 1056-1068.
- [28] KHRAIWESH B, ZHU JK, ZHU JH. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 137-148.
- [29] 刘慧春, 李明江, 金亮, 田丹青, 朱开元, 张加强, 周江华, 谭晨. 印度梨形孢对文心兰组培苗生长的影响[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(4): 642-645.
- LIU HC, LI MJ, JIN L, TIAN DQ, ZHU KY, ZHANG JQ, ZHOU JH, TAN C. Effects of *Piriformospora indica* on growth of tissue culture seedlings of *Oncidium orchid*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2019, 60(4): 642-645 (in Chinese).
- [30] YE W, SHEN CH, LIN YL, CHEN PJ, XU XM, OELMÜLLER R, YEH KW, LAI ZX. Growth promotion-related miRNAs in *Oncidium orchid* roots colonized by the endophytic fungus *Piriformospora indica*[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84920.
- [31] ŠEČIĆ E, ZANINI S, WIBBERG D, JELONEK L, BUSCHE T, KALINOWSKI J, NASFI S, THIELMANN J, IMANI J, STEINBRENNER J, KOGEL KH. A novel plant-fungal association reveals fundamental sRNA and gene expression reprogramming at the onset of symbiosis[J]. BMC Biology, 2021, 19(1): 171.