

*Pri-osa-miR164c*转化介导水稻‘Kasalath’基因组和种子抗老化能力的变化

龚贤, 曹丽娟, 曾亚, 周诗琪, 黄科瑞, 朱苗, 姜孝成*

湖南师范大学生命科学学院, 长沙410081

摘要: 基因工程技术是未来提高种子抗老化能力的理想途径。种子人工老化试验结果表明, 水稻(*Oryza sativa*) ‘Kasalath’与其农杆菌转导*pri-osa-miR164c*突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子抗老化能力存在显著差异。qRT-PCR和基因组重测序分析显示, 一方面, L8-1-2和L8-2-6-1种子的miR164c表达量分别低于和高于野生型; 另一方面, L8-1-2和L8-2-6-1的基因组发生了大量的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和插入/缺失(insertion/deletion, InDel)突变且存在显著差异。因此推测*pri-osa-miR164c*导入‘Kasalath’后引起miR164c的差异表达和基因组变异可能是突变体株系L8-1-2、L8-2-6-1种子抗老化能力或种子活力发生变化的一个重要原因。

关键词: 水稻种子; 抗老化能力; 遗传转化; miR164c; 基因组变异

水稻是世界上最主要的粮食作物之一, 全世界约有1/2人口的主粮为稻米(许惠滨等2017), 因此, 在生产实践中保证水稻的高产和稳产意义重大。水稻的正常生长发育离不开高质量种子。种子寿命或活力是判断水稻种子质量高低的一个重要生理指标(沈圣泉等2005)。种子在发育过程中, 随着有机物的逐渐积累, 蛋白质、淀粉等含量显著增加, 种子活力也随之提高, 并在生理成熟期达到峰值(刁丽荣等2016); 成熟种子在储藏过程中, 其活力会不可逆地下降, 即“劣变”或“老化”, 并伴随着许多生理生化变化, 如脂质过氧化、蛋白质降解或活性降低(Min等2017)、膜损伤、细胞器破坏、DNA损伤(Waterworth等2015)和RNA降解(Fleming等2019)等等。我国每年因水稻种子在储藏期间活力下降而造成巨大的经济损失。为延长种子寿命, 迄今主要针对不同品种种子的最适储藏时间、温度、湿度等条件开展了相关研究(耿月明等2014)。不同含水量种子分别采用牛皮纸袋和加厚PE-PA材质包装袋包装于5℃贮藏12个月后种子活力、生活力显著高于室温贮藏; 高活力种子在萌发过程中有较多的赤霉素(GA₃)积累, 脱落酸(ABA)含量较少, 从而促进种子萌发(林程等2017)。大多数种子资源通常是经过干燥处理后进行冷冻保存以延长其寿命, 因此需要投入大量资金建设并维持冷藏库或气调库运转以获得种子的最适储藏条件(Genkawa等2008)。随着水稻育种研究的不断深入和分子生物学技术的进步, 从基因水平上改良种子

的抗老化能力或储藏耐性具有广阔的应用前景。有研究发现, *LOX*、*OSALDH7*、*PIMT*等基因对水稻种子抗老化能力具有重要影响(蒋家月等2008; Shin等2009; Verma等2013; Wei等2015), Suzuki等(1992)从水稻种质库中筛选到多份*LOX3*基因缺失的耐储藏材料。miRNA也参与水稻种子活力的调控(吴多2015; Zhou等2020)。目前, 全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)在水稻遗传学相关研究方面已得到广泛应用, 该方法能快速准确地检测出全基因组中的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点、插入/缺失(insertion/deletion, InDel)位点、结构变异(structure variation, SV)位点和拷贝数变异(copy number variation, CNV)位点等, 从而发现与重要农艺性状连锁的等位基因或基因组区段, 为在基因组水平上进行分子设计育种提供了有力依据。GWAS技术在水稻的抗逆性、叶形、种子粒形、糯性相关基因的挖掘以及miRNA介导基因沉默机制等方面的研究已取得了重要进展(Zhao等2011; 王丹2017; 姜洪真等2018), 但在水稻种子抗老化能力方面尚未见研究报道。

本研究基于农杆菌转导*pri-osa-miR164c*入水稻‘Kasalath’的两个突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1

收稿 2019-12-05 修定 2020-02-22

资助 国家自然科学基金(31270348和31671773)和湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目(20134486)。

* 通讯作者(jxclc@hunnu.edu.cn)。

的种子,与野生型相比其抗老化能力有明显差异,随后我们比较了miR164c在三个材料种子中的表达量差异,并通过全基因组重测序技术(whole genome resequencing, WGR),分析了外源基因的插入位点和两个突变体株系与野生型的基因组差异,为揭示水稻种子抗老化能力的分子调控机制和利用基因工程技术改良种子抗老化能力提供了依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

水稻(*Oryza sativa* L.) ‘Kasalath’ (野生型, WT) 及其转导*pri-osa-miR164c*的突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的T₆代种子。转导水稻的方法参考Zhou等(2020)。

1.2 种子的人工老化处理和萌发试验

种子在(43±2)°C和100%相对湿度条件下进行人工老化处理,具体操作参考Zhou等(2020)的方法;种子萌发试验参考宋松泉等(2005)的方法。以胚根突出谷壳视为种子萌发,萌发率(%)=萌发种子数/供试种子数×100,计算3次重复的平均值。

1.3 总RNA提取、cDNA合成及qRT-PCR分析

使用北京全式金的TransZol Plant试剂盒,按供应商提供的操作说明提取水稻种子胚的总RNA。miRNA逆转录反应按南京诺唯赞生物科技有限公司提供的miRNA 1st strand cDNA synthesis kit (by stem-loop)及其说明进行,cDNA产物稀释10倍后置于-20°C冰箱保存备用。miR164c表达的qRT-PCR (quantitative real-time PCR)分析采用诺唯赞

的miRNA universal SYBR qPCR master mix试剂盒,反应体系为10 μL,反应程序为95°C 5 min; (95°C 10 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s)×40个循环。PCR反应后,采用65~95°C、温度间隔0.5°C进行熔解曲线分析。所有反应均在荧光定量PCR平台(PikoReal RT-PCR system, Thermo Scientific公司)进行,相关引物见表1。基因的相对表达水平通过2^{-ΔΔC_T}方法计算,设置3次生物学重复和3次技术重复。

1.4 基因组重测序分析

水稻种子萌发后,种子胚生长发育形成新的植物体,其根、茎、叶等营养组织来源于种子胚细胞的有丝分裂、伸长生长和分化,有相同的遗传组成。取水稻‘Kasalath’、突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子萌发后营养生长形成的正常植株的成熟叶片各1 g,液氮速冻后,用干冰包裹运送至晶能生物公司,在IlluminaHiSeq 3000测序平台进行基因组重测序分析。使用短reads对比软件BWA,将去除杂质序列的reads比对水稻‘日本晴’基因组(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>),从而得到水稻‘Kasalath’基因组序列信息;然后比对‘Kasalath’基因组,获得突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的基因组差异。

1.5 T-DNA插入位点的PCR验证

基于上述重测序分析获得的突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的T-DNA插入位点,利用软件Primer Premier 5设计鉴定插入位点的PCR引物(表1),正向引物为载体DNA序列,反向引物对应基因组DNA序列,L8-1-2的预期扩增片段大小约230 bp;L8-2-6-1

表1 实验所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
L8-1-2 T-DNA F	GCTGCAAAGTTAGGGTTT
L8-1-2 T-DNA R	TGCCGCCTTACAACG
L8-2-6-1 T-DNA F	TCTGGCCGTTTAATCCA
L8-2-6-1 T-DNA R	CCGTTCTTCCGAATAGCAT
<i>os-miR164c</i> F	CGCGTGGAGAAGCAGGGTA
<i>os-miR164c</i> R	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCACG
<i>U6</i> F	TACAGATAAGATTAGCATGGCCCC
<i>U6</i> R	GGACCATTTCTCGATTGTACGTG
<i>os-actin</i> F	CAATGTGCCAGCTATGTATGTCGCC
<i>os-actin</i> R	TTCCCGTTCAGCAGTGGTAGTGAAG

的预期扩增片段大小约225 bp。采用康为世纪生物公司的2×Es TaqMasterMix (Dye)试剂盒进行PCR扩增。

1.6 数据的统计分析

水稻野生型‘Kasalath’ (WT)及其突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子人工老化前后萌发率和miR164c表达量比较,采用OriginPro 9.1软件绘制图表,WT、L8-1-2和L8-2-6-1彼此间的相同老化时间处理种子的萌发率和miR164c表达量用 t -检验法进行差异显著性分析。

2 实验结果

2.1 水稻‘Kasalath’与突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1种子抗老化能力存在差异

人工老化处理后的种子萌发率变化是评价种子抗老化能力的重要生理指标。图1结果表明,未老化处理的突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子萌发率均高于野生型种子,且L8-2-6-1与野生型之间差异显著($P<0.05$);人工老化8 d时,L8-1-2和L8-2-6-1的种子萌发率分别为82%和70%,差异显著($P<0.05$),相同老化处理的野生型种子萌发率为78%,L8-1-2与野生型、L8-2-6-1与野生型之间皆差异不显著;人工老化18 d时,L8-1-2和L8-2-6-1的种子萌发率分别为64%和20%,两者差异极显著($P<0.001$),野生型种子萌发率为25%,L8-1-2与野生型之间差异极显著($P<0.01$),而L8-2-6-1与野生型之间差异不显著。因此,虽然L8-1-2和L8-2-6-1都是转导*pri-osa-miR164c*株系,但两者的种子抗老化能力出现了显著差异,即L8-1-2的种子抗老化能力高于野生型,而L8-2-6-1的种子抗老化能力低于野生型。

2.2 ‘Kasalath’与突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1种子的miR164c表达量不同

为了探讨‘Kasalath’与突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1种子抗老化力差异的分子机制,我们首先分析了*pri-osa-miR164c*导入是否引起导致突变体株系种子中miR164c表达量发生变化。图2结果表明:(1)在未老化、人工老化处理8和18 d的种子中,L8-1-2的miR164c表达量皆低于野生型,L8-2-6-1的miR164c表达量皆高于野生型;(2)三个材料的人工老化处理种子中的miR164c的表达量皆高于未

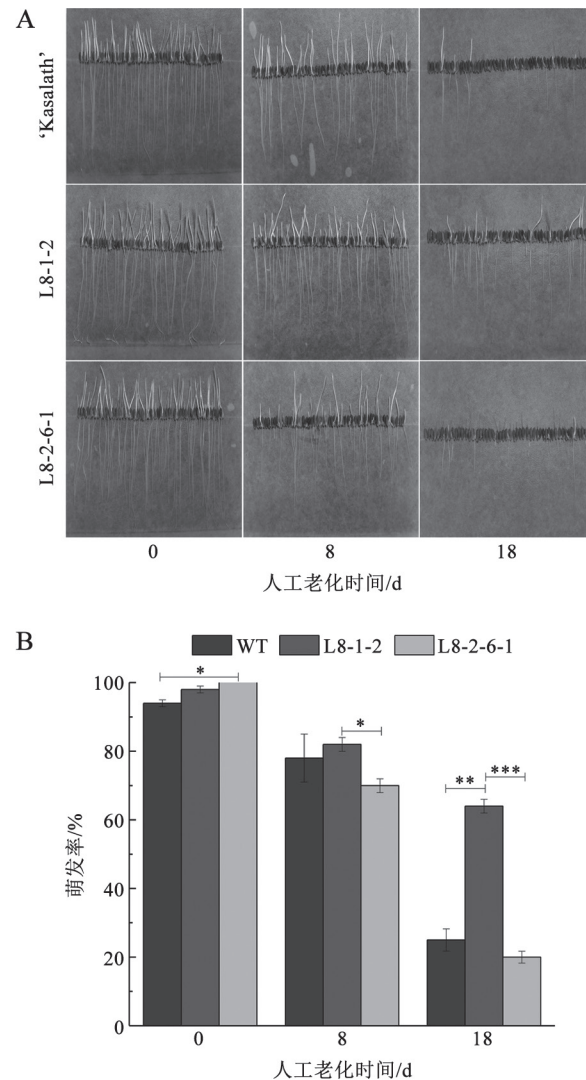


图1 水稻‘Kasalath’及其突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子人工老化前后萌发表型(A)和萌发率(B)比较

Fig.1 Comparison of the germination phenotypes (A) and germination percentage (B) of seeds of rice ‘Kasalath’ and its mutant lines L8-1-2 and L8-2-6-1 before and after artificial aging

WT: 水稻野生型‘Kasalath’, 后同。*: $P\leq 0.05$ 水平差异显著; **和***: $P\leq 0.01$ 和 $P\leq 0.001$ 水平差异极显著; 图2同此。

老化种子,且人工老化程度越高,miR164c表达量越高,即miR164c的表达量与种子抗老化能力(图1-B)呈负相关性,该结果与本研究室前期的研究结果一致(Zhou等2020)。值得注意的是,在理论上,转导*pri-osa-miR164c*会导致种子中miR164c过表达,但突变体株系L8-1-2的种子无论老化与否,

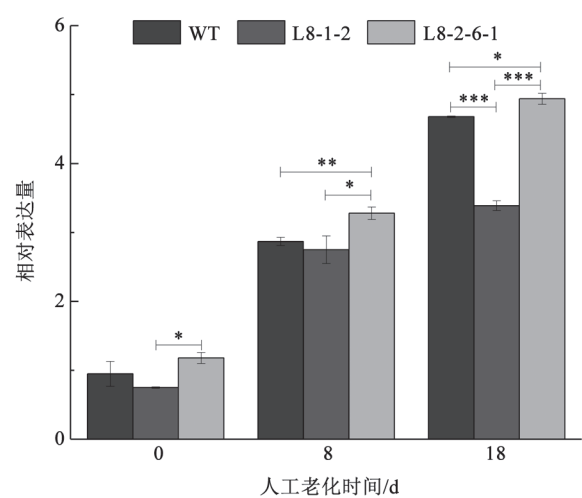


图2 水稻‘Kasalath’及其突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1种子人工老化前后的miR164c表达量比较
Fig.2 Comparison of miR164c expression in seeds of rice ‘Kasalath’ and its mutant lines L8-1-2 and L8-2-6-1 before and after artificial aging

其miR164c的表达量均低于野生型，与预期结果相反。

2.3 L8-1-2和L8-2-6-1的基因组有不同的T-DNA插入位点

基因组重测序分析表明，比对‘Kasalath’ (WT) 的基因组序列，突变体株系基因组序列上包含*priosa-miR164c*的T-DNA插入位点分别位于L8-1-2的2号染色体232 063 132 bp右侧和L8-2-6-1的4号染色体25 447 539 bp右侧，皆是基因间隔区，该结果得到了PCR分析验证(图3)。

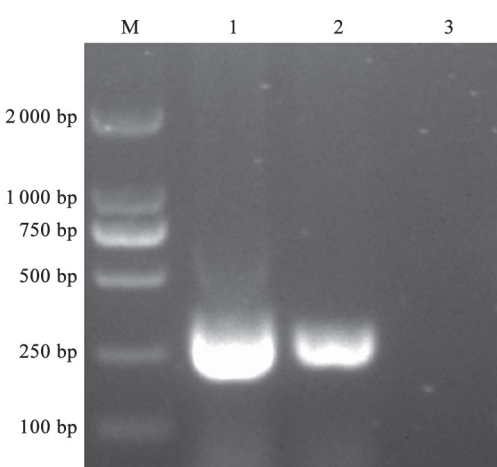


图3 L8-1-2和L8-2-6-1基因组序列的T-DNA插入位点验证
Fig.3 Verification of T-DNA insertion site in genomes of L8-1-2 and L8-2-6-1
M: DNA marker; 1: L8-2-6-1; 2: L8-1-2; 3: WT。

2.4 L8-1-2与L8-2-6-1的基因组序列差异分析

2.4.1 L8-1-2与L8-2-6-1基因组的SNPs和非同义突变氨基酸差异

比对‘Kasalath’基因组序列的结果表明(表2)，突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的SNP数量分别为3 742 174和3 741 224个，其中L8-1-2的碱基转换(transition, Ts)和颠换(transversion, Tv)数量分别为2 687 708和1 054 466个，L8-2-6-1的碱基转换和颠换数量分别为2 687 400和1 053 824个；L8-1-2的碱基转换和颠换数量分别比L8-2-6-1多308和642个，但L8-1-2和L8-2-6-1的碱基转换和颠换数量的比值几乎一致(分别为2.549和2.550)。

表2 L8-1-2和L8-2-6-1的SNPs中碱基替换的数量
Table 2 Data of base substitutions in the SNPs of L8-1-2 and L8-2-6-1

碱基替换方式	类别	碱基替换数量/个		
		L8-1-2	L8-2-6-1	Δ(L8-1-2-L8-2-6-1)
转换	A/G	1 343 651	1 343 296	355
	C/T	1 344 057	1 344 104	-47
	合计	2 687 708	2 687 400	308
颠换	A/C	276 274	276 152	122
	T/A	305 311	305 049	262
	C/G	197 021	197 033	-12
	G/T	275 860	275 590	270
	合计	1 054 466	1 053 824	642
总计		3 742 174	3 741 224	950

根据在基因组序列中的位置不同, SNP可分为三类: 基因编码区SNP (cSNP)、基因调控区SNP (pSNP)和基因间非编码区SNP (rSNP)。其中, 非同义突变(non-synonymous)的cSNP可能对生物遗传性状产生直接影响。表3结果表明, L8-1-2和L8-2-6-1的非同义突变cSNP编码的非同义突变氨基酸的数目总量分别为95 701和95 479个, 前者比后者多222个。

2.4.2 L8-1-2与L8-2-6-1基因组的InDels

InDel即插入缺失突变, 指在基因组的某个位置上发生的50 bp以下的小片段序列的插入或者删除。统计分析表明, L8-1-2和L8-2-6-1的InDels数量分别为605 029和605 018个, 其中, L8-1-2基因组的外显子区域内移码缺失(frameshift deletion) 4 243个, 移码插入(frameshift insertion) 3 807个; L8-2-6-1基因组的外显子区域内移码缺失4 223个, 移码插入3 790个。此外, 序列比对结果表明, InDels突变不但在L8-1-2和L8-2-6-1有数量差异, 而且在两个突变体株系的基因组序列上的位置和片段大小也不一样。

2.4.3 L8-1-2和L8-2-6-1各自特有的SNPs和InDels及其在染色体上分布有差异

进一步比对分析表明, L8-1-2特有的突变位点2 403个(1 760个SNPs、643个InDels), L8-2-6-1特有的突变位点2 368个(1 776个SNPs、592个InDels); 这些突变位点在染色体上呈不均匀分布, 且两个突变体株系间有明显差异(图4)。

表3 L8-1-2和L8-2-6-1中cSNPs编码的非同义突变氨基酸的数量

Table 3 Data of non-synonymous mutant amino acid encoded by cSNPs in L8-1-2 and L8-2-6-1

氨基酸	氨基酸数量/个		
	L8-1-2	L8-2-6-1	Δ(L8-1-2-L8-2-6-1)
A	9 840	9 721	119
C	2 320	2 306	14
D	4 688	4 683	5
E	4 164	4 159	5
F	2 588	2 558	30
G	6 181	6 177	4
H	3 387	3 406	-19
I	4 864	4 854	10
K	3 702	3 707	-5
L	6 126	6 141	-15
M	2 803	2 802	1
N	3 775	3 770	5
P	4 797	4 808	-11
Q	3 047	3 017	30
R	8 483	8 491	-8
S	8 216	8 204	12
T	6 246	6 224	22
V	7 662	7 658	4
W	1 022	1 017	5
Y	1 790	1 776	14
总计	95 701	95 479	222

2.4.4 L8-1-2和L8-2-6-1特有突变基因的生物信息学分析

生物信息学分析表明, L8-1-2的外显子区域特有突变基因共664个(结果未列出), 包含1 290个

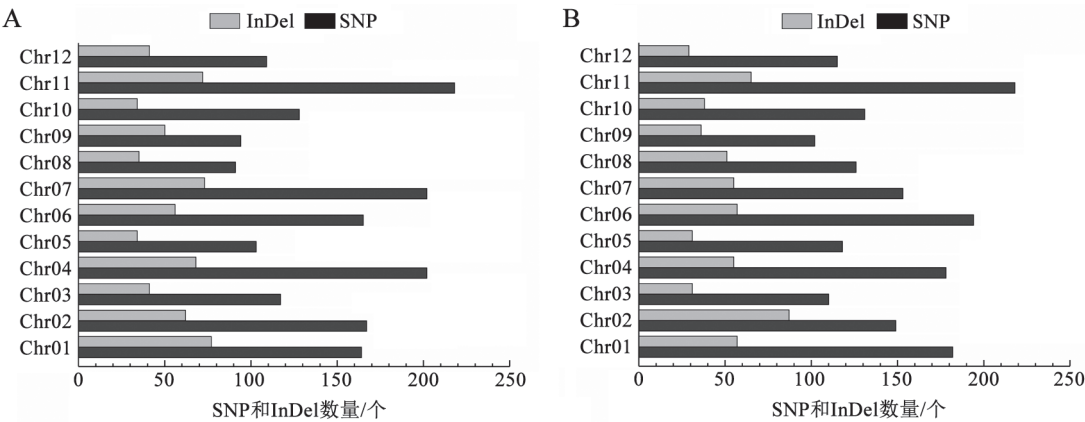


图4 L8-1-2 (A)和L8-2-6-1 (B)特有的SNPs和InDels在染色体上的分布和数量
Fig.4 Distribution and number of specific SNPs and InDels on the chromosomes of L8-1-2 (A) and L8-2-6-1 (B)

SNP和443个InDel突变, 其中386个基因只发生SNP突变(共864个), 147个基因只发生InDel突变(共193个), 131个基因同时发生多个SNP (共426个)和InDel突变(共250个); L8-2-6-1的外显子区域特有突变基因共651个(结果未列出), 包含1 252个SNP和389个InDel突变, 其中387个基因只发生SNP突变(共805个), 123个基因只发生InDel突变(共155个), 141个基因同时发生多个SNP (共447个)和InDel突变(共234个)。进一步分析表明, L8-1-2和L8-2-6-1的上述特有突变基因的非同义突变cSNPs编码氨基酸总数量分别为926和862个, 且不同类型氨基酸的数目均存在差异(图5); 其中, L8-1-2和

L8-2-6-1的单一基因外显子突变位点数 ≥ 10 的特有突变基因分别有19和15个(图6)。通过UniProt数据库查询, 这些突变基因的分子功能主要有ATP结合、氧化还原酶活性、丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶活性、其他蛋白激酶活性等类别, 有的突变基因功能未知(表4)。L8-1-2和L8-2-6-1在ATP结合、Ser/Thr蛋白激酶活性及其他蛋白激酶活性类别上均有较多的相关功能基因的位点突变, 但两者在其他分子功能类别上有明显差异, 其中, L8-1-2特有突变基因的分子功能主要为参与磷脂分解代谢过程, 与半胱氨酸型肽酶活性有关、参与蛋白质去磺酰化反应, 参与铜离子结合以及丝氨酸

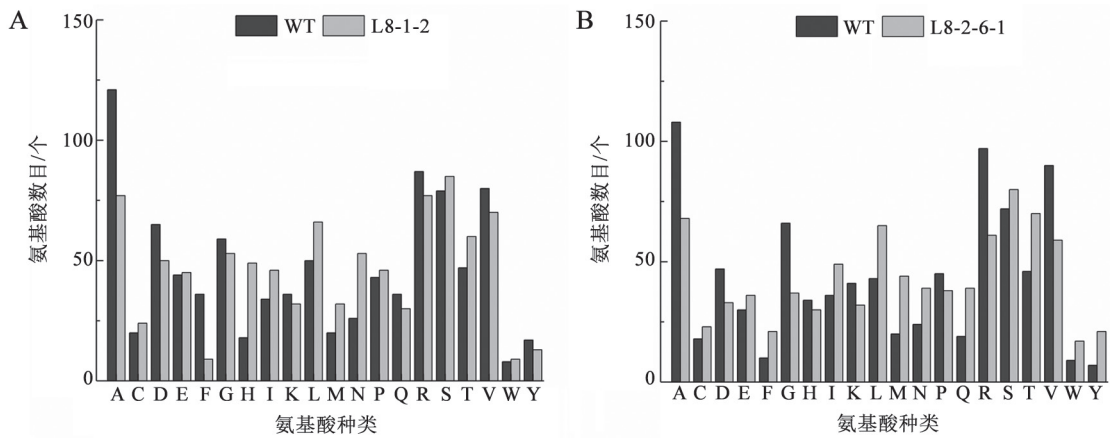


图5 L8-1-2 (A)和L8-2-6-1 (B)特有SNPs编码的非同义突变氨基酸与野生型相比的数目变化
Fig.5 Changes in the number of amino acids with non-synonymous mutation encoded by specific SNPs of L8-1-2 (A) and L8-2-6-1 (B) in compare with ‘Kasalath’ (WT)

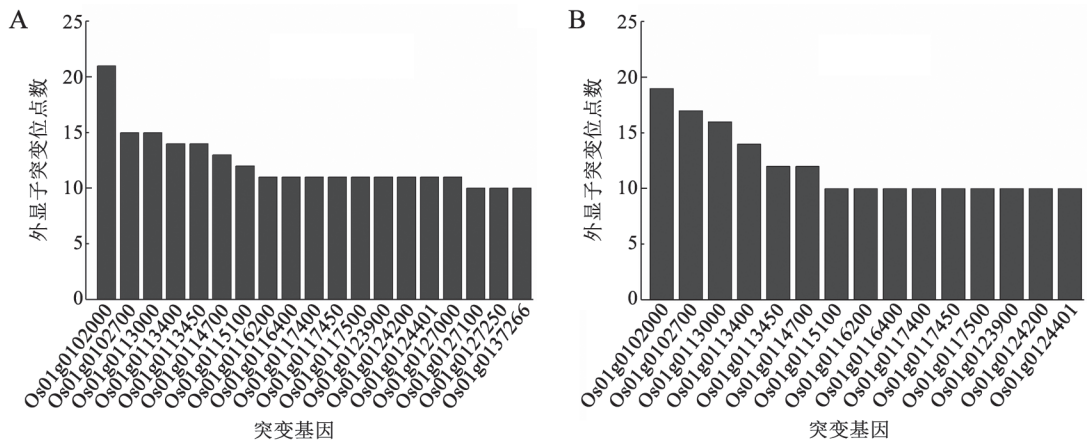


图6 L8-1-2 (A)和L8-2-6-1 (B)中外显子突变位点数大于等于10的基因
Fig.6 Genes with more than or equal to 10 mutant loci in exons of L8-1-2 (A) and L8-2-6-1 (B)

表4 L8-1-2和L8-2-6-1特有的外显子突变位点数大于等于10的基因的分子功能

Table 4 Molecular functions for the specific genes of L8-1-2 and L8-2-6-1 with more than or equal to 10 mutant loci in exons

株系	基因	外显子突变位点数			分子功能
		InDel	SNP	InDel+SNP	
L8-1-2	<i>Os01g0102000</i>	6	15	21	参与磷脂分解代谢过程
	<i>Os01g0102700</i>	0	15	15	尚不清楚
	<i>Os01g0113000</i>	6	9	15	与半胱氨酸型肽酶活性有关, 参与蛋白质去磺酰化反应
	<i>Os01g0113400</i>	8	6	14	ATP结合, 与Ser/Thr蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0113450</i>	3	11	14	尚不清楚
	<i>Os01g0114700</i>	8	5	13	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0115100</i>	1	11	12	尚不清楚
	<i>Os01g0116200</i>	0	11	11	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0116400</i>	0	11	11	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0117400</i>	7	4	11	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0117450</i>	3	8	11	尚不清楚
	<i>Os01g0117500</i>	3	8	11	ATP结合, 与Ser/Thr蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0123900</i>	0	11	11	蛋白酶抑制剂, Ser蛋白酶抑制剂
	<i>Os01g0124200</i>	2	9	11	Ser蛋白酶抑制剂
	<i>Os01g0124401</i>	4	7	11	Ser蛋白酶抑制剂
	<i>Os01g0127000</i>	2	9	11	与铜离子结合, 并与氧化还原酶活性有关
	<i>Os01g0127100</i>	0	10	10	尚不清楚
	<i>Os01g0137250</i>	1	9	10	ATP结合, 与Ser/Thr蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0137266</i>	3	7	10	尚不清楚
L8-2-6-1	<i>Os01g0100200</i>	10	9	19	尚不清楚
	<i>Os01g0100300</i>	4	13	17	能与血红素、铁离子结合, 与氧化还原酶活性有关, 作用于成对供体上, 并结合或还原氧分子
	<i>Os01g0110700</i>	4	12	16	有固碳的分子功能, 并参与三羧酸循环反应
	<i>Os01g0113700</i>	4	10	14	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0113800</i>	0	12	12	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0114100</i>	2	10	12	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关, 能与多糖结合
	<i>Os01g0115750</i>	3	7	10	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0115900</i>	4	6	10	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关
	<i>Os01g0116800</i>	0	10	10	ATP结合, 与蛋白Ser/Thr激酶活性有关
	<i>Os01g0124550</i>	0	10	10	尚不清楚
	<i>Os01g0134200</i>	0	10	10	尚不清楚
	<i>Os01g0136800</i>	1	9	10	ATP结合, 与蛋白Ser/Thr激酶活性有关并与多糖结合
	<i>Os01g0137200</i>	1	9	10	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关, 能与多糖结合
	<i>Os01g0137400</i>	4	6	10	ATP结合, 与蛋白激酶活性有关, 能与多糖结合
	<i>Os01g0150950</i>	2	8	10	尚不清楚

蛋白酶抑制剂等; 而L8-2-6-1特有突变基因的分子功能主要为与血红素、铁离子结合, 碳固定, 三羧酸循环反应及与多糖结合等。

3 讨论

水稻种子活力或储藏耐性及其分子机制研究一直备受重视。在种子贮藏过程中, 杂交水稻及其亲本不育系种子活力下降一般比常规水稻种子

更迅速, 生理生化分析表明, 杂交水稻及其亲本不育系种子浸泡液的外渗氨基酸、脂肪酸和钾离子含量均比常规水稻种子高(黄上志和傅家瑞1987)。Gao等(2016)报道氧化还原反应调节蛋白如谷胱甘肽在储藏耐性有差异的不同杂交水稻种子中表达量不同, 被认为可能有保护种子胚中蛋白质免受氧化伤害的作用; 此外, 与DNA损伤修复相关的蛋白、与脱水耐性相关的LEA蛋白(late embryogenesis

abundant protein)等在储藏耐性低的种子中也显著下调。异天冬氨酸甲基转移酶能抑制有毒的异天冬氨酸的产生、修复抗氧化酶而抑制活性氧积累和脂质过氧化等,有利于维持种子活力和寿命(Petla等2016)。

‘Kasalath’属于籼亚种含有*aus*型组分的栽培稻品种,与粳亚种相比有很高的遗传差异(Garris等2005),具有早熟、抗旱、耐低磷等优良性状,与‘日本晴’一样,是一个开发重要基因资源的种质材料(Kanamori等2013; Sakai等2014)。在我们的前期工作中,以‘Kasalath’种子愈伤组织为受体,通过农杆菌介导法转导*pri-osa-miR164c*和突变体筛选、加代繁育,获得了一批转基因株系(周艳等2013; Zhou等2020)。Zhou等(2020)报道,转导*pri-osa-miR164c*获得的突变体株系L4-1-3-1和L6-4-4-1,皆是*miR164c*过表达突变体,无论是未老化种子还是人工老化8 d的种子,*miR164c*的表达量均分别显著高于未老化和人工老化8 d的野生型种子;种子的抗老化能力则显著低于野生型种子,因此认为*miR164c*的表达负调控水稻种子活力或抗老化能力。在本研究中,无论是野生型还是突变体株系L8-1-2和L8-2-6-1的种子,*miR164c*的表达量也是人工老化处理后的种子高于未老化种子,且随老化程度加重而表达量升高,与Zhou等(2020)报道的结果一致;但是,无论是未老化种子还是人工老化种子,L8-1-2的*miR164c*表达量均低于野生型,与L8-2-6-1、L4-1-3-1和L6-4-4-1中*miR164c*表达量高于野生型形成明显差异,说明在L8-1-2的种子中,转导*pri-osa-miR164c*未能增加*miR164c*的表达量,与预期不符;但值得注意的是,在相同老化条件下,*miR164c*表达量降低的L8-1-2种子的抗老化能力高于野生型,*miR164c*表达量升高的L8-2-6-1种子的抗老化能力低于野生型,进一步证明*miR164c*的表达负调控水稻种子活力或抗老化能力。在理论上,转导*pri-osa-miR164c*的突变体株系种子的*miR164c*表达量应该高于野生型,但突变体株系L8-1-2的种子无论老化与否,其*miR164c*的表达量反而低于野生型,因此推测,*miR164c*的表达可能不仅仅受到*osa-miR164c*基因本身转录的影响,还可能因为*pri-osa-miR164c*在L8-1-2和L8-2-6-1的基因组上插入位点

不同,致使两者基因组的结构和基因表达出现差异,从而对两个突变体株系中*miR164c*表达的调控产生不同影响。*miRNA*的生物合成过程涉及其编码基因(microRNA gene, MIR)的转录、转录后前体(precursor)加工、*miRNA*稳定性、从核内输出及RISC形成等诸多事件(Yu等2017),任何影响这些事件的因素都可能造成*miRNA*表达量的差异。

基因组重测序分析表明,虽然包含*pri-osa-miR164c*的T-DNA在L8-1-2和L8-2-6-1的插入位点均在基因间隔区,但L8-1-2在2号染色体,而L8-2-6-1在4号染色体,且两个突变体株系的基因组中SNP和InDel突变存在显著差异,包括各自外显子区域特有突变基因及其非同义突变氨基酸数量均明显不同。生物信息学分析表明,这些差异基因的分子功能主要富集在ATP结合、Ser/Thr蛋白激酶和其他蛋白激酶活性等类别上。

因此,水稻种子抗老化能力或种子活力的调控可能是一个复杂的蛋白质互作网络系统工程,外源基因导入产生的基因组SNP和InDel变异相关的突变基因和*miR164c*的差异表达均可能参与其中。本文研究结果为筛选和研究与种子抗老化能力或种子活力调控相关的关键基因以及基因或蛋白质之间的相互作用调控网络提供了思路。

参考文献(References)

- Diao LR, Wei YD, Wei LY, et al (2016). Research advances and prospect on seed vigor and shelf life of rice (*Oryza sativa* L). Fujian J Agric Sci, 31: 437–443 (in Chinese with English abstract) [刁丽荣, 魏毅东, 魏林艳等(2016). 水稻种子活力和耐储性研究进展. 福建农业学报, 31: 437–443]
- Fleming MB, Hill LM, Walters C (2019). The kinetics of ageing in dry-stored seeds: a comparison of viability loss and RNA degradation in unique legacy seed collections. Ann Bot, 123: 1133–1146
- Gao JD, Fu H, Zhou XQ, et al (2016). Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa* L.) during natural aging. Plant Physiol Biochem, 103: 31–44
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, et al (2005). Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. Genetics, 169 (3): 1631–1638
- Geng YM, Wang J, Wang SC, et al (2014). Discussion on appropriate storage methods of rice seeds. China Seed Ind, (10): 45–47 (in Chinese) [耿月明, 王菁, 王世才等

- (2014). 水稻种子适宜储藏方式探讨. 中国种业, (10): 45–47]
- Genkawa T, Uchino T, Inoue A, et al (2008). Development of a low-moisture-content storage system for brown rice: storability at decreased moisture contents. *Biosyst Eng*, 99: 515–522
- Huang SZ, Fu JR (1987). The deterioration and the physiological and biochemical changes of hybrid rice seeds. *Acta Phytophysiol Sin*, 13: 229–235 (in Chinese with English abstract) [黄上志, 傅家瑞(1987). 杂交水稻和不育系种子的劣变与生理生化变化. 植物生理学报, 13: 229–235]
- Jiang HZ, Ma BJ, Qian Q, et al (2018). The application of genome-wide association study (GWAS) in crop agronomic traits. *J Agric Biotech*, 26: 1244–1257 (in Chinese with English abstract) [姜洪真, 马伯军, 钱前等(2018). 全基因组关联分析(GWAS)在作物农艺性状研究中的应用. 农业生物技术学报, 26: 1244–1257]
- Jiang JY, Song M, Wu YJ, et al (2008). Effects of lack of lipoxygenase isoenzymes Lox-1 and Lox-2 on rice grain storage characteristics. *Acta Laser Biol Sin*, 17: 395–399 (in Chinese with English abstract) [蒋家月, 宋美, 吴跃进等(2008). 水稻种胚脂肪氧化酶Lox-1, Lox-2缺失对种子储藏特性的影响. 激光生物学报, 17: 395–399]
- Kanamori H, Fujisawa M, Katagiri S, et al (2013). A BAC physical map of *aus* rice cultivar ‘Kasalath’ and the map-based genomic sequence of ‘Kasalath’ chromosome 1. *Plant J*, 76: 699–708
- Lin C, Shen HQ, Guan YJ, et al (2017). Changes of physiological, biochemistry and gene expression related to ABA and GA₃ in hybrid rice seeds stored at different moisture contents and packing methods. *Plant Physiol J*, 53: 1077–1086 (in Chinese with English abstract) [林程, 沈杭琪, 关亚静等(2017). 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后生理生化及ABA和GA₃相关基因表达的变化. 植物生理学报, 53: 1077–1086]
- Min CW, Lee SH, Cheon YE, et al (2017). In-depth proteomic analysis of *Glycine max* seeds during controlled deterioration treatment reveals a shift in seed metabolism. *J Proteomics*, 169: 125–135
- Petla BP, Kamble NU, Kumar M, et al (2016). Rice protein *L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE* isoforms differentially accumulate during seed maturation to restrict deleterious isoAsp and reactive oxygen species accumulation and are implicated in seed vigor and longevity. *New Phytol*, 211: 627–645
- Sakai H, Kanamori H, Arai-Kichise Y, et al (2014). Construction of pseudomolecule sequences of the *aus* rice cultivar Kasalath for comparative genomics of Asian cultivated rice. *DNA Res*, 21: 397–405
- Shen S, Zhuang J, Wang S, et al (2005). Analysis of QTL with main and epistatic effects of seed storability in rice. *Mol Plant Breed*, 3: 323–328 (in Chinese with English abstract) [沈圣泉, 庄杰云, 王淑珍等(2005). 水稻种子耐贮藏性QTL主效应和上位性效应分析. 分子植物育种, 3: 323–328]
- Shin JH, Kim SR, An G (2009). Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiol*, 149: 905–915
- Song SQ, Cheng HY, Long CL, et al (2005). Guide for Seed Biology Research. Beijing: Science Press (in Chinese with English abstract) [宋松泉, 程红焱, 龙春林等(2005). 种子生物学研究指南. 北京: 科学出版社]
- Suzuki Y, Higo K, Hagiwara K, et al (1992). Production and use monoclonal antibodies against rice embryo lipoxygenase-3. *Biosci Biotech Biochem*, 56: 678–679
- Verma P, Kaur H, Petla BP, et al (2013). *PROTEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2* is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. *Plant Physiol*, 161: 1141–1157
- Wang D (2017). Genome-wide association studies of cold tolerance genes at seedling stage and bacterial blight resistance genes in rice (dissertation). Changsha: Hunan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [王丹(2017). GWAS定位水稻苗期耐冷基因和抗白叶枯基因(学位论文). 长沙: 湖南农业大学]
- Waterworth WM, Bray CM, West CE (2015). The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *J Exp Bot*, 66: 3549–3558
- Wei YD, Xu HB, Diao LR, et al (2015). Protein repair *L-isoaspartylmethyltransferase 1 (PIMT1)* in rice improves seed longevity by preserving embryo vigor and viability. *Plant Mol Biol*, 89: 475–492
- Wu D (2015). The molecular mechanism of regulating seed vigor by miR164c and miR168a (dissertation). Changsha: Hunan Normal University (in Chinese with English abstract) [吴多(2015). miR164c和miR168a调控种子活力的分子机制研究(学位论文). 长沙: 湖南师范大学]
- Xu HB, Jiang MR, Lian L, et al (2017). Research process on rice grain storability. *Fujian Agr Sci Technol*, (11): 41–44 (in Chinese with English abstract) [许惠滨, 江敏榕, 连玲等(2017). 稻谷耐储性研究进展. 福建农业科技, (11): 41–44]
- Yu Y, Jia TR, Chen XM (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytol*, 216: 1002–1017
- Zhao KY, Tung CW, Eizenga GC, et al (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat Commun*, 2: 467

- Zhou Y, Huang YP, Zhou Y, et al (2013). Study on the method for efficient and rapid genetic transformation of Kasalath mediated by *Agrobacterium*. J Hunan Agr Univ (Nat Sci), 39: 471–476 (in Chinese with English abstract) [周艳, 黄亚萍, 周遥等(2013). 农杆菌介导的遗传转化籼稻Kasalath的条件优化. 湖南农业大学学报(自然科学版), 39: 471–476]
- Zhou Y, Zhou SQ, Wang LP, et al (2020). miR164c and miR168a regulate seed vigor in rice. J Integr Plant Biol, 62 (4): 470–486

***Pri-osa-miR164c* transformation induces genome variations and changes in anti-aging capacity of seeds for rice ‘Kasalath’**

GONG Xian, CAO Lijuan, ZENG Ya, ZHOU Shiqi, HUANG Kerui, ZHU Miao, JIANG Xiaocheng*
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: The application of genetic engineering will be an ideal way to improve the anti-aging capacity of seeds. In the present study, the results of artificial-aging test for seeds indicated that there were significant differences among the anti-aging capacity of seeds of rice (*Oryza sativa*) ‘Kasalath’ and its agrobacterium-mediated *pri-osa-miR164c* transformed mutant lines L8-1-2 and L8-2-6-1. qRT-PCR and genome resequencing analysis showed that the expression level of miR164c in seeds of L8-1-2 and L8-2-6-1 were lower and higher than that in the wild type respectively; on the other hand, the transformation of *pri-osa-miR164c* led to a large number of single nucleotide polymorphism (SNP) and insertion/deletion (InDel) in genome of the two mutant lines and the mutations were significantly different with each other. Therefore, it is speculated that the differential expression of miR164c and genome variation induced by *pri-osa-miR164c* transformation may contribute to the difference in anti-aging capacity or vigor of L8-1-2 and L8-2-6-1 seeds.

Key words: rice seed; anti-aging capacity; genetic transformation; miR164c; genome variation

Received 2019-12-05 Accepted 2020-02-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270348 and 31671773), and Hunan Provincial Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology (20134486).

*Corresponding author (jxclc@hunnu.edu.cn).