

microRNA 介导雨生红球藻在高光胁迫下次级细胞壁形成和虾青素积累的分子机制*

陈 锋^{1,2} 胡朝阳^{1,2} 孙 雪^{1,2} 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院 浙江宁波 315211; 2. 浙江省海洋生物工程重点实验室 浙江宁波 315211)

摘要 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是天然虾青素的最佳来源,它可以在高光胁迫等不利条件下转变成厚壁细胞并积累大量虾青素。然而,目前从微小 RNA (microRNA, miRNA)层面来揭示在高光胁迫下雨生红球藻次级细胞壁形成和虾青素合成的机理研究尚未见报道。对高光处理下三个时间点的雨生红球藻样品进行 microRNA 测序,共鉴定出 342 个已知 miRNA 和 283 个新 miRNA。在这 625 个 miRNA 中,其中有 206 个 miRNA 的表达量受高光影响,这些差异表达的 miRNA 的靶基因参与了淀粉与蔗糖代谢、甘露糖与果糖代谢、糖酵解和核苷类骨架生物合成等重要代谢通路。结合转录组结果发现,高光胁迫下有 6 个 miRNA 调控了 3 个和次级细胞壁形成相关靶基因的表达,有 5 个 miRNA 调控了 5 个和虾青素生物合成相关靶基因的表达。以上结果揭示了雨生红球藻在高光下 miRNA 调控次级细胞壁形成和虾青素生物合成的潜在机制,为雨生红球藻虾青素的代谢工程奠定了理论基础。

关键词 雨生红球藻; microRNA; 次级细胞壁; 虾青素; 高光胁迫

中图分类号 Q946; Q789; S968.4 doi: 10.11693/hyhz20220800205

虾青素(3,3'-二羟基- β,β -1-胡萝卜素-4,4'-二酮)是一种天然存在的类胡萝卜素(Gong *et al.*, 2016)。虾青素的基本结构由一个 40 碳不饱和骨架组成,并由一个基本的异戊二烯结构进行生物合成(Ambati *et al.*, 2014)。虾青素最先以赋予鲑科鱼类(鲑鱼和鳟鱼)、虾、龙虾粉红色肉质而闻名,在它们的生长和繁殖过程中发挥着重要作用,因此被广泛应用于水产养殖(Lim *et al.*, 2018)。从营养的角度来看,虾青素被认为是自然界中最强大的抗氧化剂,抗氧化能力是维生素 E 的 550 倍。多项研究表明,虾青素不仅可以有效地调节人体免疫力,还可以预防肿瘤和心血管疾病,治疗、缓解阿尔茨海默病和帕金森病相关的神经损伤,因此在水产养殖、化妆品和医药等领域得到了广泛的应用,具有巨大的市场价值(Miyawaki *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2013; Galasso *et al.*, 2018)。

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种单细胞绿藻,在高光、氮饥饿和高盐等非生物胁迫下,可以积累其干重 4%以上的虾青素,是目前自然界中最优的虾青素生产者(Fábregas *et al.*, 2003)。胁迫条件会引发雨生红球藻细胞内活性氧的暴发,它在调节雨生红球藻类胡萝卜素合成和虾青素积累中起着关键作用,其中,高光是诱导虾青素积累的最有效的条件(Hu *et al.*, 2020)。雨生红球藻有着复杂的生活史,根据形态和生理特征可以分为游动细胞和不动细胞(Zhang *et al.*, 2019)。在适宜的条件下,藻细胞呈绿色游动状态,通过细胞增殖来增加生物量。在胁迫条件下,藻细胞的增殖受到抑制,其游动细胞的鞭毛开始脱落进而转变成不动细胞,同时伴随着次级细胞壁的形成以及虾青素的大量积累(Hu *et al.*, 2019)。因此,利用雨生红球藻进行虾青素的生产需要两个阶段,

*国家自然科学基金项目,31572638 号。陈 锋, 硕士研究生, E-mail: chenfenngbu@163.com

通信作者: 徐年军, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2022-08-01, 收修改稿日期: 2022-10-03

即在低光下积累生物量, 在高光下积累虾青素。然而, 在虾青素积累阶段, 藻细胞的厚壁结构导致下游加工的高能耗以及较低的虾青素提取效率, 这些极大地限制了雨生红球藻虾青素的商业化生产(Yu *et al.*, 2021)。因此, 了解次级细胞壁和虾青素生物合成的调控机制对雨生红球藻虾青素产业具有重要意义。

MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 18~30 nt 的非编码小 RNA (small RNA, sRNA), 通过互补 mRNA 调节基因的表达(Chen *et al.*, 2011)。miRNA 作为一种重要的转录后调控因子, 具有调节植物生长发育和响应环境胁迫的功能。近些年来, 研究人员利用高通量 miRNA 测序技术, 在高等植物和微藻中鉴定出大量保守和新的 miRNA, 并对这些 miRNA 的靶基因进行了功能预测。例如, 在拟南芥(*Arabidopsis*) 中发现 miR319 参与调控了花瓣、叶片的发育以及种子中油脂的积累(Todesco *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020), 在棉花(*Gossypium hirsutum*) 中 miR160 调控花药的发育和棉纤维伸长相关的 miRNA (Liu *et al.*, 2019)。在微藻中, 最早和最全面的 miRNA 研究是在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 中(Molnár *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2018), 在盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*) 中发现了 111 个响应高光胁迫的 miRNAs(Lou *et al.*, 2020)。此外, 只有一篇文献对雨生红球藻的 miRNA 进行了报道, 该研究发现了 115 个响应高光和醋酸钠胁迫的 miRNAs (Wang *et al.*, 2021)。因此, 可以看出目前和雨生红球藻 miRNA 相关的研究仍然十分匮乏。

在本研究中, 通过 BGISEQ-500 高通量测序技术, 我们鉴定了雨生红球藻在高光胁迫下从绿色游动细胞转变为红色不动细胞这一过程中差异表达的 miRNA, 并对其表达模式和靶基因进行了分析和预测。结合我们之前的转录组研究, 阐明了这些差异表达的 miRNA 和其靶基因在高光胁迫诱导雨生红球藻次级细胞壁形成和虾青素合成过程中的调控作用。本研究不仅为理解雨生红球藻次级细胞壁形成和虾青素生物合成的潜在分子机制提供了新的思路, 也为深入开展雨生红球藻中 miRNA 的功能研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 雨生红球藻的培养和处理

实验用雨生红球藻来自宁波大学藻种库, 藻株编号为 NBU489。雨生红球藻采用两步法培养: 在第一阶段, 绿色藻细胞在含有 150 mL 无菌 NBU3#培养基的 250 mL 锥形瓶中培养, 细胞初始接种量为

0.25×10^5 cells/mL, 培养温度为 24 °C, 光强为 25 $\mu\text{mol photon}/(\text{m}^2 \text{ s})$, 光暗周期为 12 h:12 h。第二阶段, 取 60 mL 培养至平台期的雨生红球藻液转移至新的 100 mL 锥形瓶中进行连续高光照强度培养, 光强为 140~150 $\mu\text{mol photon}/(\text{m}^2 \text{ s})$ 。每升 NBU3#培养基由以下成分组成(单位: mg): NaNO_3 , 100; Na_2EDTA , 20; K_2HPO_4 , 10; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5; MnSO_4 , 0.25; VB_{12} , 5×10^{-4} ; VB_1 , 0.012 (Hu *et al.*, 2020)。

分别在高光培养 0 d (HL_0D)、1 d (HL_1D) 和 5 d (HL_5D) 离心收集藻体, 将藻体沉淀先在液氮中冷冻后在 -80 °C 保存, 每组样品设置三个生物学重复。

1.2 总 RNA 的提取与测序数据质控

使用 Trizol 试剂(上海生工)从雨生红球藻样品中提取总 RNA, 检测合格的 RNA 样品送至华大基因进行 miRNA 测序, 测序平台为 BGISEQ-500。对测序所得原始序列进行去接头、去除低质量序列等数据过滤过程得到可信的有效标签序列, 并对其序列的数目和长度分布进行统计。

1.3 miRNA 的鉴定与靶基因预测

利用比对软件 AASRA 将有效标签序列比对到雨生红球藻 mRNA 数据库和其他 sRNA 数据库(Tang *et al.*, 2021), 雨生红球藻小 RNA 按照 miRbase (<https://www.mirbase.org/>) > pirnabank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/>) > snoRNA (<http://www.snorna.biotoul.fr/>) > Rfam (<http://rfam.xfam.org/>) 的顺序进行注释。基于 miRNA 的前体能够形成发夹二级结构, 我们使用 miRA 软件进行新的 miRNA 预测(Evers *et al.*, 2015), 对得到的 miRNA 使用 TPM 标准化来进行表达水平的定量(Zhao *et al.*, 2020)。使用 psRobot (Wu *et al.*, 2012) 和 TargetFinder 软件(Fahlgren *et al.*, 2010)对得到的 miRNA 进行靶基因的预测, 结合自由能、得分值等条件对靶基因进行过滤, 最终取两个软件的交集作为最终的靶基因预测结果。

1.4 差异表达 miRNA 及其 GO 和 KEGG 富集分析

采用 DESeq 方法进行负二项分布的差异表达分析(Wang *et al.*, 2010)。以 Q 值 < 0.001 和差异倍数的绝对值 > 2 作为两个阈值筛选不同对照组的差异表达 miRNA (Differentially expressed miRNA, DE miRNA), 根据 DE miRNA 筛选结果, 使用 R 软件中的 pheatmap 函数对其进行层次聚类分析。

利用 KEGG 数据库和 GO 数据库对 DE miRNA 对应的靶基因进行 KEGG 通路和 GO 富集分析(He *et al.*, 2018), 来研究 miRNA 调控次级细胞壁合成和虾青素生物合成的分子机制。

2 结果与分析

2.1 sRNA-seq 的数据质控和分析

我们对高光处理 0 d (HL_0D)、1 d (HL_1D)和 5 d (HL_5D)的雨生红球藻样品构建了 9 个 sRNA 文库,用于高通量测序,样品和之前用于转录组分析的样品是一致的(Hu *et al.*, 2019)。如表 1 所示,HL_0D、HL_1D 和 HL_5D 三组雨生红球藻样品测序共产生了 2.5×10^8 条原始数据,去除低质量数据后,从三个时间点的样品中分别得到了 25 594 806、25 049 571 和 23 165 827 条有效标签序列,这些干净序列比对上参考基因组的平均比对率分别达到 86.87%、87.14%和 88.35%。上述 9 个样品的 Q20 值均超过 98.6%,说明本研究中 sRNA-seq 数据质量良好,可满足后续分析需要。

2.2 高光胁迫下雨生红球藻 miRNA 的鉴定及结构特征

我们对测序所得的高光胁迫下雨生红球藻的 miRNA 序列与 miRBase、snoRNA、Rfam、siRNA 等非编码数据库进行比对,共鉴定出 342 个已知

miRNA,其中在高光 0 d、1 d 和 5 d 处理组中分别鉴定到 310、188 和 188 个已知 miRNA,这些 miRNA 序列与植物中已知的 miRNA 序列高度一致。基于 miRNA 的前体能够形成发夹二级结构这一原理,利用 miRA 软件(Evers *et al.*, 2015)预测出 283 个新 miRNA,其中 199 个位于 DNA 的正义链上,84 个位于 DNA 的负义链上,这些新 miRNA 的前体都具有典型的茎环发夹二级结构。

植物中 miRNA 序列的长度主要集中在 21 nt,上述 625 个 miRNA 的长度分布介于 18~30 nt 之间,长度为 21 nt (206 个)的 miRNA 数量最多,与莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、玉米(*Zea mays* L)类似(Molnár *et al.*, 2007; 王琪月等, 2018),其次是 30 nt (85 个)和 22 nt (78 个),其中,已知的 miRNA 的长度分布在 18~24 nt,长度为 25~30 nt 的 miRNA 全部为预测的新 miRNA,这些 miRNA 序列长度分布范围与 Dicer 酶切割的特征一致(Wang *et al.*, 2021)。此外,19~23 nt 的 miRNA 的首位碱基分布偏向为 U,而 25~30 nt 的 miRNA 偏向 C,24 nt 的 miRNA 偏向 A(图 1)。

表 1 sRNA-seq 数据总览
Tab.1 Overview of the sRNA-seq dataset

样品	原始读段	有效标签序列	比对率/%	Q20 值
HL_0D_1	27 784 020	25 575 038	88.76	99.0
HL_0D_2	29 896 729	28 339 719	83.97	98.8
HL_0D_3	29 845 259	28 376 865	87.87	99.0
HL_1D_1	28 571 881	27 147 825	86.65	98.7
HL_1D_2	27 846 889	26 413 804	86.89	98.8
HL_1D_3	30 123 818	28 756 826	87.06	98.7
HL_5D_1	20 150 462	19 058 074	85.46	98.6
HL_5D_2	29 241 738	27 225 145	89.43	98.7
HL_5D_3	28 342 432	26 397 593	90.17	98.8

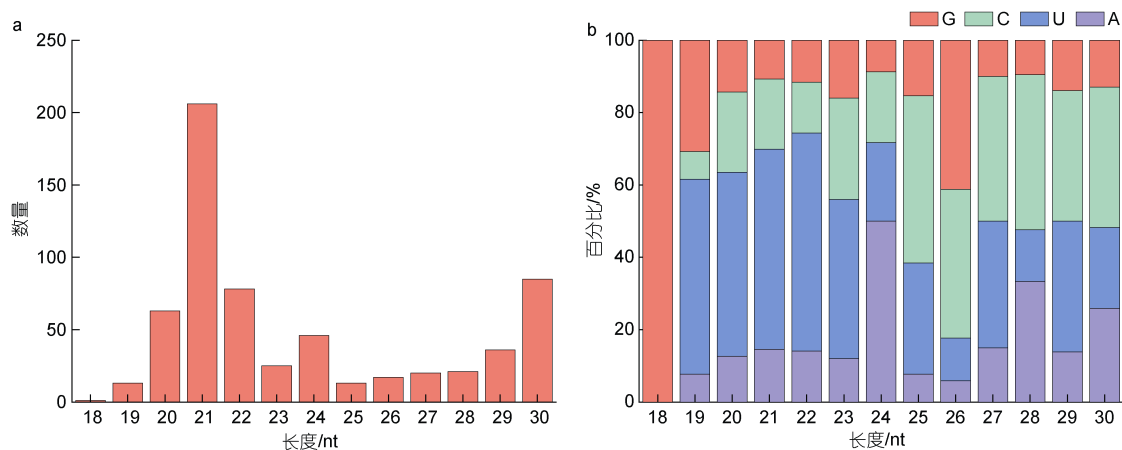


图 1 雨生红球藻在高光胁迫下的 miRNA 长度分布(a)和首位碱基偏好(b)

Fig.1 The miRNA length distribution (a) and the first nucleotide bias (b) in *H. pluvialis* under high light stress

注: G: 鸟嘌呤; C: 胞嘧啶; U: 尿嘧啶; A: 腺嘌呤

2.3 高光胁迫下雨生红球藻 DEmiRNA 分析

为了研究雨生红球藻在高光胁迫下 miRNA 的响应变化, 根据 $Q < 0.001$ 和 $|\text{变化倍数}| \geq 2$ 条件对 DEmiRNA 进行了筛选(图 2)。在 HL_0D vs HL_1D、HL_0D vs HL_5D 和 HL_1D vs HL_5D 这三个比较组中分别发现了 123、172 和 78 个 DEmiRNA, 其中显著上调的 miRNA 分别为 15、48 和 54 个, 显著下调的 miRNA 分别为 108、124 和 24 个(图 2a)。与其他

两组不同, HL_1D vs HL_5D 组的 DEmiRNA 数量最少, 且上调的 DEmiRNA 多于下调的 DEmiRNA。对三个比较组的 DEmiRNA 进行差异倍数聚类分析发现, miRNA 在雨生红球藻响应高光胁迫过程中呈动态表达, HL_0D vs HL_1D 和其他两组被聚类在不同分支上, 这些结果说明雨生红球藻在高光 1 d 时的初始 miRNA 表达模式与其他时间点有着较大差异(图 2b)。

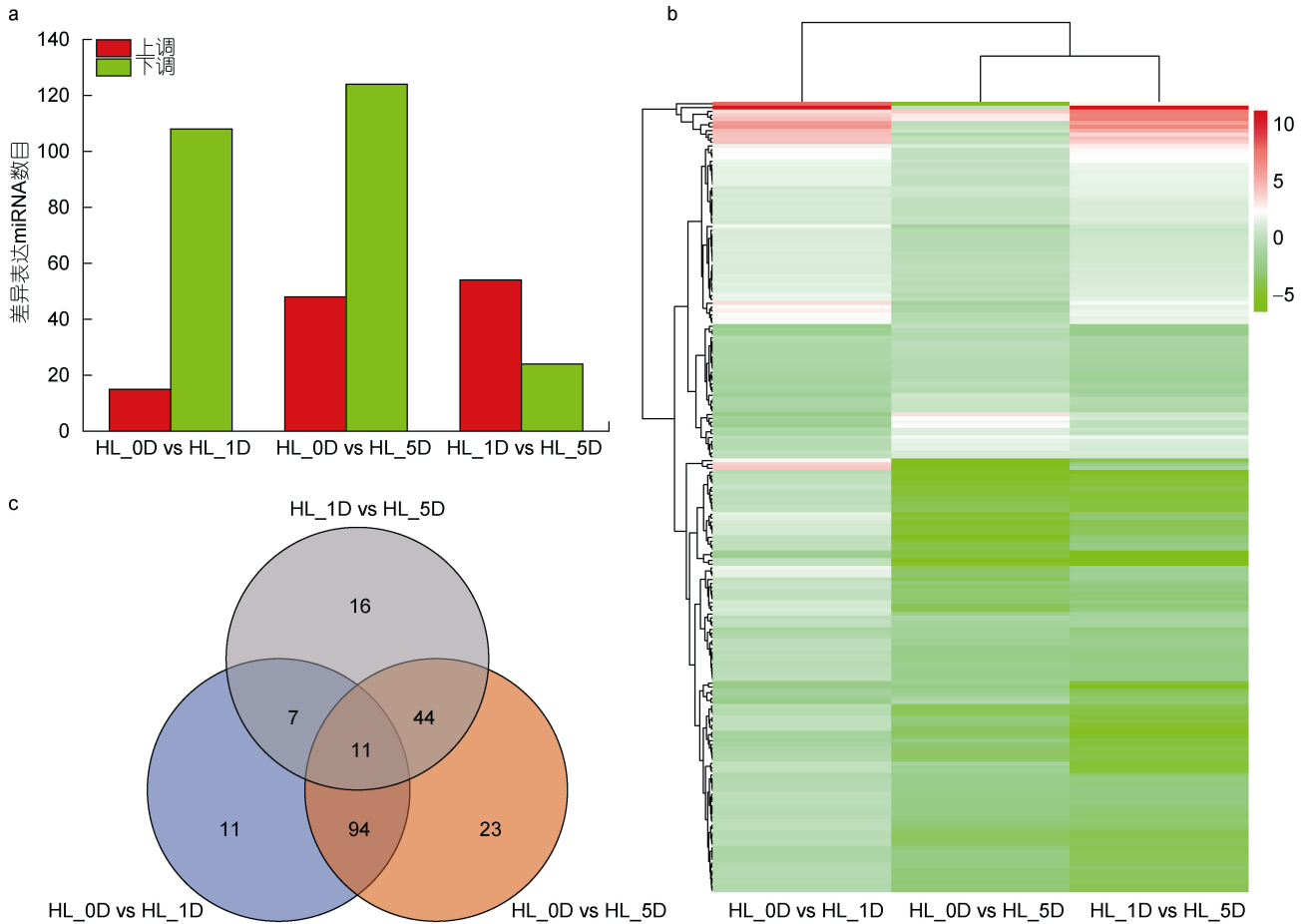


图 2 各个高光比较组中 miRNA 的差异表达分析

Fig.2 Differential expression analysis of miRNAs in each comparison group

注: a. 各个比较组中差异表达的 miRNA; b. 各个比较组中 miRNA 表达水平的热图分析; c. 各个比较组中 miRNA 的维恩分析

从维恩图(图 2c)中可见, 分别有 11 个、23 个和 16 个 miRNA 在三个比较组中特异性表达, 有 11 个 miRNA 在三组中均具有显著差异。对这 11 个 DEmiRNA 进一步分析发现, 和高光第 0 天相比, novel_mir51、novel_mir253、novel_mir187、novel_mir143 这四个 miRNA 在第 1 天和第 5 天都是显著上调的, novel_mir106 和 miR319a_1 这两个 miRNA 在第 1 天和第 5 天都是显著下调的, 而 miR171b-3p、novel_mir259、novel_mir260、novel_mir66 和 novel_

mir29 这 5 个 miRNA 在高光第 1 天时显著下调的而在第 5 天时又显著上调了。miR319a 是一类在植物叶片发育和抗逆有着重要调控作用的 miRNA (Bresso *et al.*, 2018), 最新的研究表明, 在拟南芥中过表达 miR319a 会抑制脂肪酸的积累(Wang *et al.*, 2020)。雨生红球藻在高光胁迫下会快速积累大量油脂, 用于储存虾青素酯和抵抗逆境, 与第 0 天相比, miR319a 的表达在高光 1 d 和 5 d 时是一直显著下调的, 这说明雨生红球藻在高光胁迫下可能通过下调 miR319a_1

的表达量来减弱对油脂合成相关的基因的抑制,从而促进了油脂的生物合成,来缓解高光胁迫对藻细胞的伤害。miR171b-3p 也是一种在植物中和代谢过程相关的 miRNA,在乌龙茶(*Camellia sinensis*)中它通过抑制类黄酮物质的生物合成,从而增强了萜类化合物的生物合成(Zhu *et al.*, 2020)。萜类化合物是虾青素生物合成的前体,这类物质的含量变化与雨生红球藻中虾青素的合成密切相关,该 miRNA 在雨生红球藻响应高光胁迫过程中表现出先下调后上调的趋势,说明它可能参与调控了和虾青素合成相关前体萜类物质的代谢过程。这些结果表明,雨生红球藻在高光胁迫下的 miRNA 有着高度阶段性或时期特异性表达的特点。此外,上述 11 个在三个时间段均显著差异表达 miRNA 中,有 9 个为新鉴定出的 miRNA,

数量远大于已知 miRNA (2 个),推测这些差异表达的新 miRNA 在雨生红球藻响应高光胁迫过程中可能发挥了重要作用,值得进一步研究,这些新 miRNA 的序列信息如表 2 所示。

此外,DEmiRNA 的表达谱结果显示,在三个时间点下表达量前三的均为新 miRNA,高光处理 0 d 时表达量最高的是 novel_mir119 (TPM=5 966.52)、novel_mir147 (TPM=1 923.06)、novel_mir72 (1 035.28);高光处理 1 d 时表达量最高的是 novel_mir121 (TPM=5 190.84)、novel_mir119 (TPM=3 606.68)、novel_mir155 (411.33);高光处理 5 d 时表达量最高的是 novel_mir121 (TPM=5 190.84)、novel_mir147 (TPM=4 133.33)、novel_mir119 (2 345.90)。这些高表达的新 miRNA 的序列信息也列在表 2。

表 2 差异表达的新 miRNA 序列信息
Tab.2 Sequence information of differentially expressed novel miRNAs

miRNA ID	miRNA 序列	TPM 值		
		HL_0D	HL_1D	HL_5D
novel_mir29	GTGAGGTTCAATTGGAGGCAGGGTGGGGCCA	4.41	1.67	15.50
novel_mir51	AATGGCAAAGCGCTTCTCGGTCCACTGGCC	1.41	16.52	234.19
novel_mir66	TGGACAGTTAGGTCCGCGT	38.17	13.04	95.61
novel_mir72	CAAACCTTGTCGGATTGGGCTG	1 035.28	628.39	477.28
novel_mir106	TGACACAGCAATCTGAAGGAGG	15.92	5.23	1.58
novel_mir147	CGCGTACCTCCGACACTCAACTGACCGCCG	1 923.06	2 709.80	4 133.34
novel_mir155	GTTGGTGTGACAGAGGTAGCGGGCTATTGC	430.67	411.33	238.29
novel_mir119	CGCCGTCAGAGTCCAGGGTGTA	5 966.52	3 606.68	2345.90
novel_mir121	TCAGGGCGATCATTGGGACACGACCTCAC	5 157.95	5 190.84	4313.60
novel_mir143	CAAGCGGCAGCGGTGACGGCCGG	1.03	5.31	105.62
novel_mir187	CTGCCGGTCATCAAAGTCCCGGGTG	34.20	57.07	260.42
novel_mir253	CCAGCAGGGCATGGGCGTGTTCAGCC	2.22	11.60	345.27 7
novel_mir259	CCGACCTTGCCTTCCTTTGTGC	0.40	0.000 1	2.31
novel_mir260	GTGTGGTGAAGTCCGGTGCAGGCGACG	9.93	2.55	37.49

2.4 DEmiRNA 的靶基因预测及功能分析

由于 miRNA 通过结合下游靶基因来发挥其生物学功能,因此我们利用 TargetFinder 和 psRobot 软件对雨生红球藻在高光胁迫下的具有显著差异的 miRNA 进行了靶基因预测。结果显示,HL_0D vs HL_1D、HL_0D vs HL_5D、HL_1D vs HL_5D 三个比较组共有 274 个 DEmiRNA 对应 3018 个靶基因。不同 miRNA 的靶基因数目差距很大,大部分 miRNA 都有靶向两个以上基因,靶基因数量最多的是 miR160a-5p,有 58 个靶基因,而 miR482a_1、miR159a_1 和 novel_mir106 等 35 个 miRNA 都仅有 1 个靶基因。研究表明,与 miR160a-5p 高度同源的 miR160a_A05 参与调控了棉花中棉纤维的合成(Liu *et al.*, 2019)。在

miR160a-5p 的靶基因中发现它可以靶向内切葡聚糖酶(纤维素酶的一种)基因,推测 miR160a-5p 也可能参与了雨生红球藻中纤维素的代谢。

为了进一步研究高光胁迫下雨生红球藻 DEmiRNA 的功能,对上述三组 DEmiRNA 的靶基因分别进行 GO 注释分类分析。GO 显著性富集结果所图 3 所示,HL_0D vs HL_1D、HL_0D vs HL_5D、HL_1D vs HL_5D 比较组分别注释到 38、41 和 36 个 GO 条目,包括生物过程,细胞组分和分子功能三大类。在 HL_0D vs HL_1D 组中分别有 447、755、363 条靶基因被富集到生物学过程、细胞组分和分子功能,其中富集靶基因数最多的是催化活性(165 个);在 HL_0D vs HL_5D 组中分别有 802、1 015、508 条靶

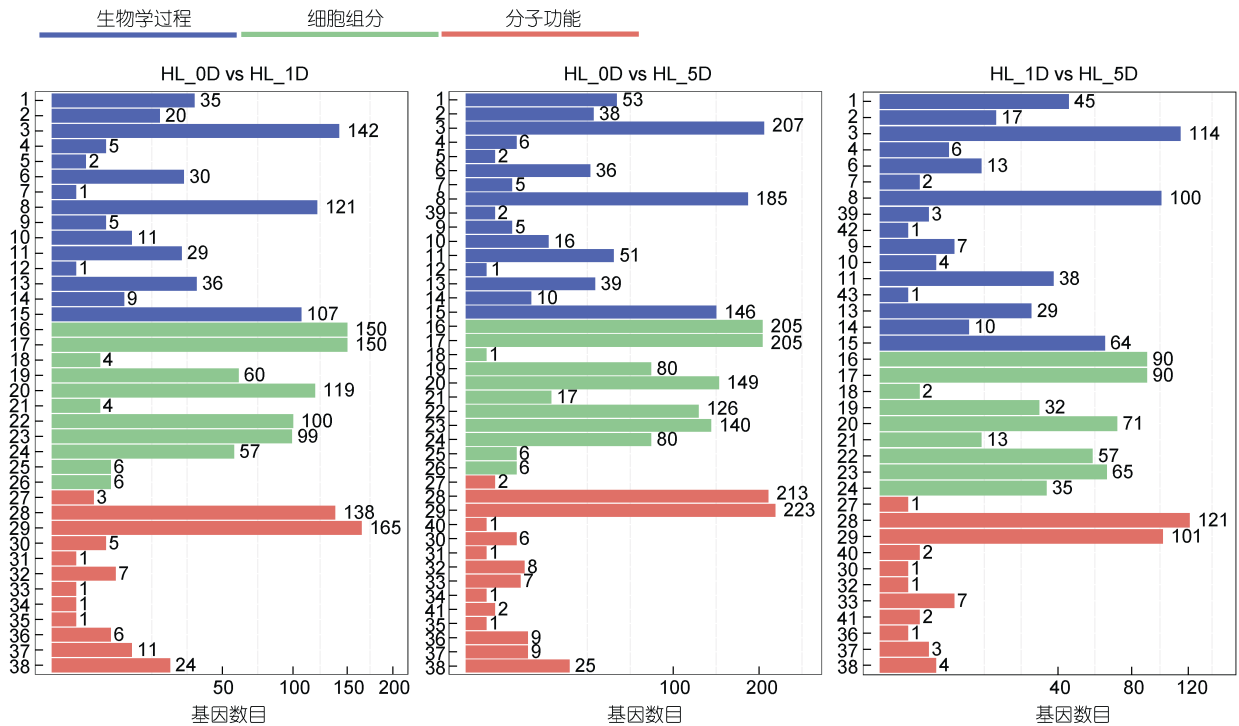


图3 各个比较组中 DEmiRNA 靶基因的 GO 数据库注释

Fig.3 The GO database annotation of DEmiRNA's target genes in each comparison group

注: 1. 生物调控; 2. 细胞组织部分或生物合成; 3. 细胞过程; 4. 发育过程; 5. 生长; 6. 定位; 7. 运动; 8. 生物代谢进程; 9. 生物过程的负调控; 10. 生物过程的正调控; 11. 生物过程调控; 12. 繁殖; 13. 对刺激的反应; 14. 信号传导; 15. 单一机体过程; 16. 细胞; 17. 细胞部分; 18. 细胞外组分; 19. 大分子复合物; 20. 膜结构; 21. 膜关闭内腔; 22. 膜部分; 23. 细胞器; 24. 细胞器部分; 25. 病毒粒子; 26. 病毒粒子部分; 27. 抗氧化活性; 28. 结合功能; 29. 催化活性; 30. 酶调节活性; 31. 鸟苷-核苷酸交换因子活性; 32. 分子转导活性; 33. 核酸结合转录因子活性; 34. 营养存储库活性; 35. 蛋白标签; 36. 受体活性; 37. 结构分子活性; 38. 转运活性; 39. 多细胞生物过程; 40. 电子载体活性; 41. 蛋白质结合转录因子活性; 42. 有机体进程; 43. 生殖过程

基因被富集到生物学过程、细胞组分和分子功能, 其中富集靶基因数最多的也是催化活性(223 个); 在 HL_1D vs HL_5D 组中分别有 454、455、244 条靶基因被富集到生物学过程、细胞组分和分子功能, 其中富集靶基因数最多的是结合功能(121 个)。

KEGG 注释分类结果显示, 共有 1 381 条靶基因被注释到 20 个二级 KEGG 通路, 其中被注释到靶基因数量最多的是代谢一级通路, 共有 736 个(53.3%) 靶基因。结果如图 4 所示, 在代谢一级通路中靶基因数量前三的通路分别为全局和总览图、其他氨基酸的代谢和碳水化合物代谢, 其中碳水化合物代谢通路中的部分靶基因被富集到淀粉与蔗糖代谢、果糖与甘露糖代谢、糖酵解和 TCA 循环这四个通路, 这些靶基因可能调控了雨生红球藻次级细胞壁的形成和虾青素碳骨架的合成。此外, 萜类和聚酮类化合物代谢中的部分靶基因被富集到萜类骨架生物合成通路, 可能参与调控了虾青素前体物质的生物合成(Du *et al*, 2021a)。脂质代谢通路中的相关靶基因

可能会参与到油脂和脂肪酸的合成, 雨生红球藻在高光胁迫下, 虾青素和油脂是同步积累的并且虾青素经过酯化反应后储存在三酰甘油中(Du *et al*, 2021b)。

2.5 高光胁迫下雨生红球藻 DEmiRNA 参与的次级细胞壁和虾青素合成途径分析

根据靶基因的 KEGG 数据库注释信息和前期研究中的转录组结果, 我们针对性分析了雨生红球藻中次级细胞壁生物合成以及虾青素生物合成这两个生理过程中的 DEmiRNA 和靶基因之间的调控作用。本文主要找到 4 条和这两个生理过程有关的 KEGG 通路, 包括蔗糖和淀粉代谢、果糖和甘露糖代谢、糖酵解、萜类骨架合成。这 4 条通路中共涉及 13 个 DEmiRNA, 其中 8 个 DEmiRNA 结合 9 个蔗糖和淀粉代谢通路相关靶基因, 2 个 DEmiRNA 结合 2 个果糖和甘露糖代谢通路相关靶基因, 5 个 DEmiRNA 结合 5 个糖酵解通路相关靶基因, 2 个 DEmiRNA 结合 2 个萜类骨架生物合成通路相关靶基因。

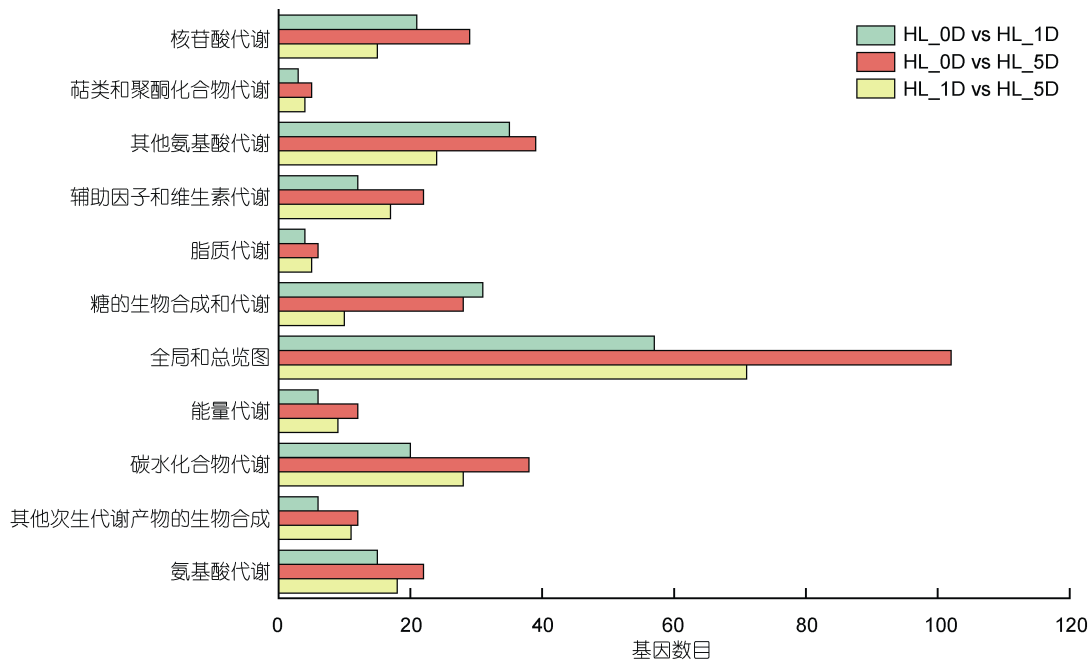


图 4 各个比较组中 DEmiRNA 靶基因的 KEGG 数据库注释

Fig.4 The KEGG database annotation of DEmiRNA's target genes in each comparison group

甘露糖和纤维素是雨生红球藻红色不动细胞次级细胞壁的主要组成成分,其中甘露糖占有细胞壁糖类的 80% (Lin *et al*, 2021)。对于植物来说, GDP-甘露糖是主要的核苷酸糖之一,它不仅参与调控细胞壁的形成,还为甘露糖的生物合成提供底物 (Figueroa *et al*, 2021)。DEmiRNA 和转录组结果(图 5a)共同显示,与第 0 天相比,高光处理组中和次级细胞壁合成相关通路上的葡萄糖磷酸变位酶(*PGM*)、内切葡聚糖酶(*EG*)和甘露聚糖内切-1,4- β -甘露糖苷酶(*MAN*)基因的表达均显著上调。其中, *novel_mir167* 结合两个靶基因调控了 *PGM* 基因的表达, *miR160a-5p*、*novel_mir146*、*miR172b-5p_5* 和 *novel_mir281* 这 4 个 miRNA 分别结合对应的靶基因共同调控了 *EG* 基因的表达, *novel_mir66* 结合靶基因调控了 *MAN* 基因的表达。在雨生红球藻次级细胞壁的生物合成过程中,纤维素合成酶和纤维素酶基因的表达都会明显上调,前者可以催化纤维素的生物合成,为细胞壁提供刚性结构,后者可以水解纤维素,为 GDP-甘露糖的生物合成提供原料 (Guo *et al*, 2021)。因此,在高光条件下,上述纤维素合成和代谢相关的 miRNA 可能通过上调次级细胞壁底物合成相关靶基因的表达水平,来调控雨生红球藻次级细胞壁的生物合成。值得一提的是,在 4 个调控内切葡聚糖酶的 miRNA 中, *miR160a-5p* 和 *miR172b-5p_5* 的在高光下的表达显著

下调,而 *novel_mir146* 和 *novel_mir281* 的表达显著上调,调控甘露聚糖内切-1,4- β -甘露糖苷酶的 *novel_mir66* 在高光第 1 天的表达显著下调,但是在第 5 天时的表达显著上调,虽然这些 miRNA 的表达模式不同,但最终都上调了靶基因的表达。这些结果不仅说明了这 5 个 miRNA 在雨生红球藻次级细胞壁形成中存在着重要调控作用,还体现了 miRNA 和 mRNA 相互作用的复杂性。

糖酵解是生物体中一个基本的代谢途径,该过程将葡萄糖分解成 2 个三碳代谢物并释放能量 (Yu *et al*, 2022)。淀粉和蔗糖代谢途径中产生的 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖大部分直接进入糖酵解途径,部分进入磷酸戊糖代谢途径,这两个代谢途径都为虾青素的合成提供前体和能量 (Du *et al*, 2021a)。DEmiRNA 和转录组结果共同显示(图 5b),糖酵解途径中的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因(*ALDO*)和丙酮酸脱氢酶 E2 组分基因(*DLAT*)在高光处理下是显著上调的,这两个基因分别是 *novel_mir182* 和 *novel_mir102* 的靶基因。*ALDO* 基因负责催化裂解 1,6-二磷酸-果糖生成甘油醛-3 磷酸,随后和丙酮酸进入萜类骨架生物合成途径形成虾青素前体物质异戊烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP),在萜类骨架生物合成途径中, *novel_mir245* 和 *novel_mir77* 共同上调了该途径中法尼基焦磷酸合酶基因(*FDPS*)和关键酶牻牛

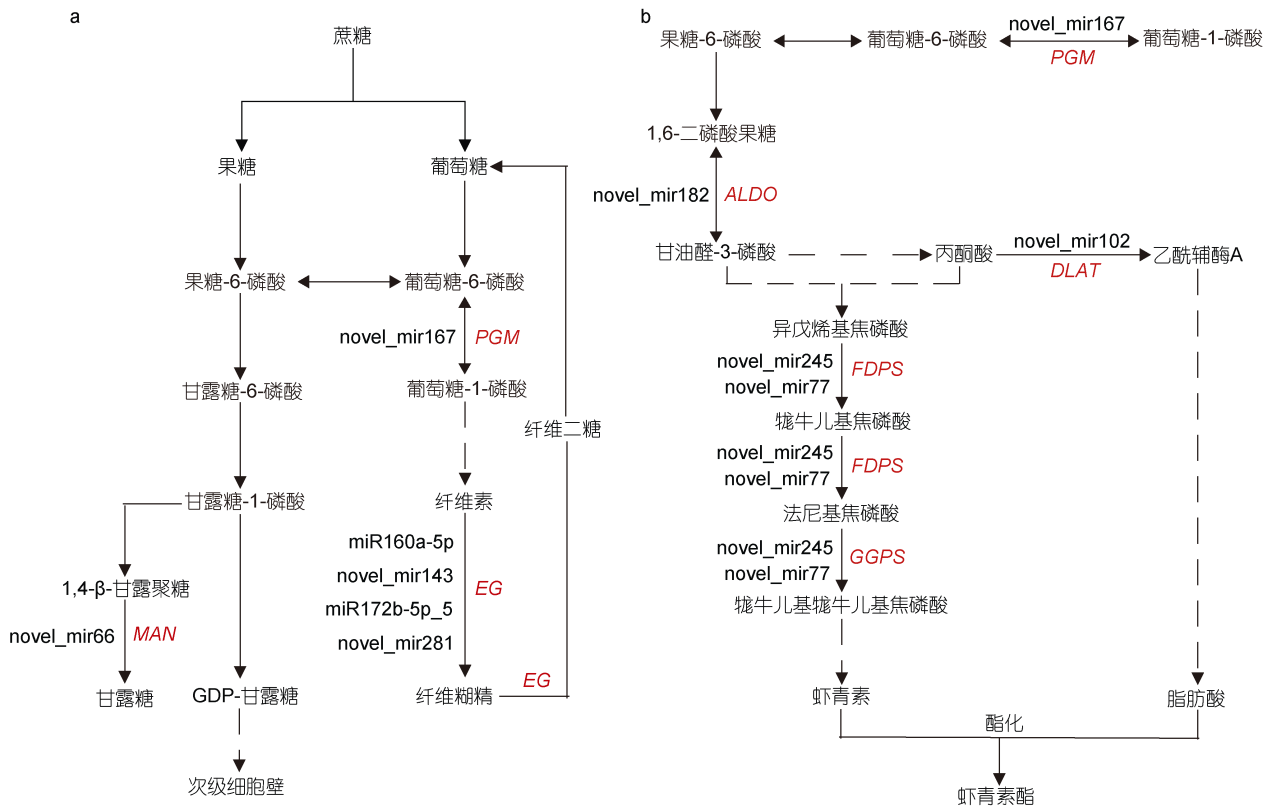


图 5 雨生红球藻高光下 DEmiRNA-mRNA 在次级细胞壁形成(a)和虾青素生物合成(b)的调控作用

Fig.5 The regulatory role of DEmiRNA-mRNA on secondary cell wall formation (a) and astaxanthin biosynthesis (b) under high light in *H. pluvialis*

儿基牻牛儿基焦磷酸合酶基因(*GGPS*)的表达,为虾青素的合成提供了更多的萜类骨架。丙酮酸也可以通过丙酮酸脱氢酶复合体转化为乙酰 CoA,该复合体主要由丙酮酸脱氢酶(E1, EC 1.2.4.1)、二氢硫辛酸转乙酰化酶(E2, EC 2.3.1.12)和二氢硫辛酸脱氢酶(E3, EC 1.8.1.4)组成,乙酰 CoA 是脂肪酸生物合成的底物(Gwak *et al*, 2014),研究表明雨生红球藻和小球藻(*Chlorella zofingiensis*)中乙酰 CoA 含量还和虾青素的

生物合成具有很强的相关性(Zhang *et al*, 2016)。这些结果表明, *novel_mir182*、*novel_mir102*、*novel_mir245*和 *novel_mir77* 可能通过调控糖酵解和萜类骨架生物合成途径来增加虾青素和脂肪酸生物合成的底物,从而促进了雨生红球藻在高光下虾青素的合成。上述雨生红球藻在高光下次级细胞壁形成和虾青素生物合成过程中起重要调控作用的 DEmiRNA 的详细信息如表 3 所示。

表 3 次级细胞壁形成和虾青素生物合成相关的 DEmiRNA

Tab.3 The DEmiRNAs relating to the secondary cell wall formation and astaxanthin biosynthesis

miRNA ID	miRNA 序列	靶基因
<i>novel_mir167</i>	AGGTGTAGCCATGCATGCGT	葡萄糖磷酸变位酶
<i>miR160a-5p</i>	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	内切葡聚糖酶
<i>novel_mir143</i>	CAAGGCGGCAGCGGTCAGGCCGG	内切葡聚糖酶
<i>miR172b-5p_5</i>	GCAGCACCATTAAGATTACAC	内切葡聚糖酶
<i>novel_mir281</i>	CACCTTGGCCAGCCAGATCTT	内切葡聚糖酶
<i>novel_mir66</i>	TGGACAGTTAGTCCGCGT	甘露聚糖内切-1,4-β-甘露糖苷酶
<i>novel_mir182</i>	CCATGGTGACGCCAGGACCCTG	果糖-二磷酸醛缩酶
<i>novel_mir102</i>	AACCATGCGAGCCTTGATGTTGTGGTCAGC	丙酮酸脱氢酶 E2 组分
<i>novel_mir245</i>	GCGTTGGTAAACGTTGCCAATGGTCGTCAT	法尼基焦磷酸合成酶/牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶
<i>novel_mir77</i>	ATCGGACAAGGTTGGCCGAAG	法尼基焦磷酸合成酶/牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶

3 结论

从高光胁迫下的雨生红球藻的 sRNA 高通量测序结果中, 我们共鉴定出 342 个已知 miRNA 和 283 个新 miRNA。对这些 miRNA 进行了差异表达分析和靶基因预测, 并结合转录组结果, 本文揭示了高光下雨生红球藻次级细胞壁和虾青素合成相关的 DEmiRNA 及其靶基因的潜在调控关系。结果发现包括 miR160-5p、novel_mir143、novel_mir102、novel_mir245 在内的 10 个 miRNA 参与了高光胁迫下雨生红球藻次级细胞壁的形成和虾青素的生物合成。本研究不仅丰富了雨生红球藻 miRNA 相关的信息, 还从 miRNA 层面增加了高光下雨生红球藻次级细胞壁形成和虾青素的生物合成机制的新的见解。

参 考 文 献

- 王琪月, 孟淑君, 张柯, 等, 2018. 玉米雌穗发育杂种优势相关 miRNA 的研究[J]. 作物学报, 44(6): 796-813.
- AMBATI R R, PHANG S M, RAVI S, *et al*, 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review [J]. *Marine Drugs*, 12(1): 128-152.
- BRESSO E G, CHOROSTECKI U, RODRIGUEZ R E, *et al*, 2018. Spatial control of gene expression by miR319-regulated TCP transcription factors in leaf development [J]. *Plant Physiology*, 176(2): 1694-1708.
- CHEN C J, LIU Q, ZHANG Y C, *et al*, 2011. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus [J]. *RNA Biology*, 8(3): 538-547.
- DU F C, HU C Y, SUN X, *et al*, 2021a. Transcriptome analysis reveals pathways responsible for the promoting effect of sucrose on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light condition [J]. *Aquaculture*, 530: 735757.
- DU F C, HU C Y, SUN X, *et al*, 2021b. Transcriptome analysis reveals the promoting effect of trisodium citrate on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light condition [J]. *Aquaculture*, 543: 736978.
- EVERS M, HUTTNER M, DUECK A, *et al*, 2015. miRA: adaptable novel miRNA identification in plants using small RNA sequencing data [J]. *BMC Bioinformatics*, 16: 370.
- FÁBREGAS J, DOMÍNGUEZ A, MASEDA A, *et al*, 2003. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5): 545-551.
- FAHLGREN N, CARRINGTON J C, 2010. miRNA target prediction in plants [M] // MEYERS B C, GREEN P J. *Plant MicroRNAs*. New York: Humana Press: 51-57.
- FIGUEROA C M, LUNN J E, IGLESIAS A A, 2021. Nucleotide-sugar metabolism in plants: the legacy of Luis F. Leloir [J]. *Journal of Experimental Botany*, 72(11): 4053-4067.
- GALASSO C, OREFICE I, PELLONE P, *et al*, 2018. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives? [J]. *Marine Drugs*, 16(8): 247.
- GONG M Y, BASSI A, 2016. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments [J]. *Biotechnology Advances*, 34(8): 1396-1412.
- GUO C L, MEI R, ANWAR M, *et al*, 2021. The functionally characterization of putative genes involved in the formation of mannose in the aplanospore cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) [J]. *Metabolites*, 11(11): 725.
- GWAK Y, HWANG Y S, WANG B B, *et al*, 2014. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 65(15): 4317-4334.
- HE B X, HOU L L, DONG M M, *et al*, 2018. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and Fe²⁺ [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1): 175.
- HU C Y, CUI D D, SUN X, *et al*, 2019. Transcriptomic analysis unveils survival strategies of autotrophic *Haematococcus pluvialis* against high light stress [J]. *Aquaculture*, 513: 734430.
- HU C Y, CUI D D, SUN X, *et al*, 2020. Primary metabolism is associated with the astaxanthin biosynthesis in the green algae *Haematococcus pluvialis* under light stress [J]. *Algal Research*, 46: 101768.
- LIM K C, YUSOFF F M, SHARIFF M, *et al*, 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals [J]. *Reviews in Aquaculture*, 10(3): 738-773.
- LIN J, YAN H L, ZHAO L, *et al*, 2021. Interaction between the cell walls of microalgal host and fungal carbohydrate-activate enzymes is essential for the pathogenic parasitism process [J]. *Environmental Microbiology*, 23(9): 5114-5130.
- LIU G Y, LIU J, PEI W F, *et al*, 2019. Analysis of the *MIR160* gene family and the role of *MIR160a_A05* in regulating fiber length in cotton [J]. *Planta*, 250(6): 2147-2158.
- LOU S L, SUN T, LI H, *et al*, 2018. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in unicellular model alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 11: 244.
- LOU S L, ZHU X L, ZENG Z Y, *et al*, 2020. Identification of microRNAs response to high light and salinity that involved in beta-carotene accumulation in microalga *Dunaliella salina* [J]. *Algal Research*, 48: 101925.
- MIYAWAKI H, TAKAHASHI J, TSUKAHARA H, *et al*, 2008. Effects of astaxanthin on human blood rheology [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(2): 69-74.
- MOLNÁR A, SCHWACH F, STUDHOLME D J, *et al*, 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Nature*, 447(7148):

- 1126-1129.
- RAO A R, SINDHUJA H N, DHARMESH S M, *et al.*, 2013. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16): 3842-3851.
- TANG C, XIE Y M, GUO M, 2021. AASRA: An anchor alignment-based small RNA annotation pipeline [J]. *Biology of Reproduction*, 105(1): 267-277.
- TODESCO M, RUBIO-SOMOZA I, PAZ-ARES J, *et al.*, 2010. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 6(7): e1001031.
- WANG L K, FENG Z X, WANG X, *et al.*, 2010. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. *Bioinformatics*, 26(1): 136-138.
- WANG X D, MIAO X X, CHEN G, *et al.*, 2021. Identification of microRNAs involved in astaxanthin accumulation responding to high light and high sodium acetate (NaAC) stresses in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Algal Research*, 54: 102179.
- WANG F L, ZHENG T, HU Z H, *et al.*, 2020. Overexpression of miR319a altered oil body morphogenesis and lipid content in *Arabidopsis* seeds [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 38(4): 531-537.
- WU H J, MA Y K, CHEN T, *et al.*, 2012. PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox [J]. *Nucleic Acids Research*, 40(W1): W22-W28.
- YU C L, WANG H P, QIAO T S, *et al.*, 2021. A fed-batch feeding with succinic acid strategy for astaxanthin and lipid hyperproduction in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 340: 125648.
- YU W J, ZHANG L T, ZHAO J, *et al.*, 2022. Enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by exogenous oxaloacetate combined with nitrogen deficiency [J]. *Bioresource Technology*, 345: 126484.
- ZHANG Z, SUN D Z, MAO X M, *et al.*, 2016. The crosstalk between astaxanthin, fatty acids and reactive oxygen species in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* [J]. *Algal Research*, 19: 178-183.
- ZHANG C H, ZHANG L T, LIU J G, 2019. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage [J]. *Journal of Applied Phycology*, 31(2): 1001-1008.
- ZHAO S R, YE Z, STANTON R, 2020. Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols [J]. *RNA*, 26(8): 903-909.
- ZHU C, ZHANG S T, ZHOU C Z, *et al.*, 2020. Integrated transcriptome, microRNA, and phytochemical analyses reveal roles of phytohormone signal transduction and ABC transporters in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*) during solar withering [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(45): 12749-12767.

THE MECHANISM UNDERLYING MICRORNA-MEDIATED SECONDARY CELL WALL FORMATION AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION UNDER HIGH LIGHT STRESS IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

CHEN Feng^{1,2}, HU Chao-Yang^{1,2}, SUN Xue^{1,2}, XU Nian-Jun^{1,2}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract *Haematococcus pluvialis* is the best source of natural astaxanthin, can transform into thick-walled cells for accumulating large amounts of astaxanthin under unfavorable conditions such as high light. However, there are lack of studies at microRNA (miRNA) level on the mechanism of secondary cell wall formation and astaxanthin biosynthesis under high light stress in *H. pluvialis*. In this study, microRNA sequencing was performed in *H. pluvialis* treated with high light at three time points. A total of 342 known miRNAs and 283 novel miRNAs were identified, among which 206 miRNAs were differentially expressed under high light. The target genes of these differentially expressed miRNAs (DEmiRNA) were involved in important metabolic pathways such as starch and sucrose metabolism, mannose and fructose metabolism, and glycolysis and terpene backbone biosynthesis. We found that combined with the transcriptome results, six miRNAs regulated the expression of three target genes that related to the secondary cell wall formation, and five miRNAs regulated the expression of five target genes that related to astaxanthin biosynthesis under high light stress. These results revealed the underlying mechanism of miRNA regulation of the secondary cell wall formation and astaxanthin biosynthesis under high light in *H. pluvialis*, and laid a theoretic foundation for metabolic engineering of astaxanthin in *H. pluvialis*.

Key words *Haematococcus pluvialis*; microRNA; secondary cell wall; astaxanthin; high light stress