

植物环状 RNA 研究进展

高振¹, 骆萌¹, 王磊¹, 宋士任¹, 赵丽萍¹, 许文平¹, 张才喜¹,
王世平^{1,2,*}, 马超^{1,*}

(¹上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; ²山东省农业科学院农产品研究所/山东省农产品精深加工技术重点实验室, 济南 250100)

摘要: 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类经反向剪接后、由 3' 末端和 5' 末端共价结合形成的单链非编码 RNA 分子, 广泛存在于多种生物体中, 具有结构稳定、细胞或组织特异性等特征。circRNA 具有多种功能, 可作为 miRNA “海绵” 调控 miRNA 表达; 促进来源基因转录; 通过与蛋白互作参与相关途径调控等。多种植物 circRNA 的研究结果暗示其在生物胁迫、非生物胁迫及生长发育中发挥重要作用。对植物 circRNA 分子特征和作用机制的研究现状进行综述, 并结合动物中 circRNA 的研究进展, 讨论植物 circRNA 的潜在作用机制, 并提出植物中尚未解决的问题及其未来的应用前景。

关键词: circRNA; 非编码 RNA; 作用机制; 生物学功能

中图分类号: Q 752; Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2019) 01-0171-11

The Research Advance of Plant Circular RNA

GAO Zhen¹, LUO Meng¹, WANG Lei¹, SONG Shiren¹, ZHAO Liping¹, XU Wenping¹, ZHANG Caixi¹,
WANG Shiping^{1,2,*}, and MA Chao^{1,*}

(¹School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; ²Institute of Agro-food Science and Technology/Key Laboratory of Agro-products Processing Technology of Shandong, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

Abstract: Circular RNAs are a class of single-stranded non-coding RNA characterized by the presence of a covalent bond linking the 3' and 5' ends generated by backsplicing. Widespread circRNAs were found to be expressed in various organisms. CircRNAs feature stable structure and often show cell-, tissue-, or developmental-stage-specific expression. Some researches showed that circRNAs have been postulated to function as miRNA sponges, to enhance transcription of their host genes, also function as protein decoys and participate in the regulation of pathway. Dramatically increased investigations suggest circRNAs potentially regulate a wide range of biological progresses related to biotic/abiotic responses and plant development. Here, we summarize the features of circRNAs in plant, and their regulatory roles achieved so far. In addition, possible functional mechanism of plant circRNAs is inspired by animals, and the challenges and questions in the research area of plant circRNAs are discussed.

Keywords: circRNA; non-coding RNA; action mechanism; biology function

收稿日期: 2018-09-25; **修回日期:** 2019-01-07

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (17ZR1448800); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-29-zp-7); 上海交通大学晨星—优秀青年学者奖励计划项目 (2017)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fruit@sjtu.edu.cn, chaoma2015@sjtu.edu.cn)

植物非编码 RNA 类型多样,包括转运 RNA(tRNA)、核糖体 RNA(rRNA)、微小 RNA(miRNA)、小干扰 RNA(siRNA)、反式作用 siRNA(tasiRNA)、小核 RNA(snRNA)、小核仁 RNA(snoRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circular RNA, circRNA)等。

circRNA 是一种由 3'末端和 5'末端共价结合的闭合单链 RNA,于 20 世纪 70 年代在植物病毒体中首次被发现(Sanger et al., 1976)。然而,由于 circRNA 低丰度表达、闭环结构等特点,长期以来被视为 RNA 异常剪接中的副产品或“转录噪音”,并未受到研究者的重视。近年来随着高通量测序技术和生物信息学的发展,研究者已经证实 circRNA 广泛存在于真核生物中,其在生命活动中发挥的重要作用也在逐渐被揭示(Wang et al., 2014; Lu et al., 2015; Lee et al., 2017; Shen et al., 2017)。植物 circRNA 具有许多明显区别于动物的特征,在功能上显现出参与植物发育调控及胁迫反应过程(Lee et al., 2017)。总结近年来植物 circRNA 研究成果,同时结合动物中前沿研究分析植物中 circRNA 的潜在功能,并探讨了未来的研究方向,以期能为植物 circRNA 的下一步研究提供参考。

1 植物中 circRNA 的鉴定

2014 年在模式植物拟南芥中首次发现植物 circRNA 以来(Wang et al., 2014),目前共有 15 个植物物种涉及 circRNA 的研究报道,包括单子叶植物水稻、大麦、小麦和玉米,双子叶植物拟南芥、辣椒、大豆、马铃薯、番茄、猕猴桃、沙棘、棉花、枸橘、梨和茶树。由于取样组织、测序深度或鉴定软件不同,报道的物种间 circRNA 数量差异较大。如 Ye 等(2015)从水稻的根系和拟南芥的叶片中分别鉴定出 12 037 和 6 012 个 circRNA;而 Lu 等(2015)在水稻的成熟叶片和圆锥花序中鉴定到 2 354 个 circRNA。截止目前,已经有 4 个植物 circRNA 检索及分析网站建立,为植物 circRNA 研究提供了便利(Chu et al., 2017; Ye et al., 2017b; Zhang et al., 2017; Meng et al., 2018)。

circRNA 的预测分析是开展其功能机制研究的基础。植物 circRNA 预测的方法,如 CIRI(Gao et al., 2015)、CIRI_AS(Gao et al., 2017)、CIRCexplorer2(Zhang et al., 2016)、find_circ(Memczak et al., 2013)、MapSplice(Wang et al., 2010)和 Segemehl(Hoffmann et al., 2014)等,均是基于以人类和动物 circRNA 为研究对象开发,不完全适用于植物 circRNA 的形成特征(Chen et al., 2016)。Chen 等(2016)开发的 PcircRNA_finder 特异针对植物 circRNA 的鉴定软件,有望能更准确有效地识别植物中的 circRNA,但是此方法的可靠性及可应用性需要进一步检验(Chu et al., 2018)。近来有报道建议利用多个 circRNA 鉴定工具共同预测可以获得较为理想的结果(Hansen et al., 2016; Hansen, 2018)。但由于植物 circRNA 的低丰度,限制了 circRNA 的鉴定,虽然不同植物物种已被报道存在大量的 circRNA,其真实数量可能被低估,可靠灵敏鉴定方法的开发及推广迫在眉睫。

2 植物中 circRNA 的特征

2.1 植物 circRNA 的稳定性

circRNA 具有结构稳定的特征。circRNA 为不具有 5'端帽子和 3'端多聚腺苷酸尾巴的共价闭环环状结构(图 1),这使得 circRNA 比线性 RNA 稳定,不易被核酸外切酶和核糖核酸酶降解(Salzman et al., 2012; Suzuki & Tsukahara, 2014)。因此,经核酸外切酶 RNase R 处理后仍稳定存在,可以作为判定 RNA 成环的一个重要条件。目前植物中许多研究运用 RNase R 处理样品 RNA,从而富集 circRNA,以便于鉴定(Lu et al., 2015; Tan et al., 2017)。

2.2 植物 circRNA 的保守性

植物 circRNA 的保守性分析结果存在差别。有研究发现 circRNA 在不同植物物种之间存在一定的保守性。Ye 等 (2015) 报道水稻和拟南芥之间超过 700 个来源基因存在同源性, 并有超过 300 个同源基因在相似的位置产生 circRNA。对拟南芥、水稻和大豆分别可以产生 circRNA 的 8 362、9 385 和 1 995 个亲本基因进行保守性分析发现, 大豆和拟南芥之间有 685 个高度同源, 大豆与水稻之间有 1 095 个高度同源, 3 个物种中共有 551 个高度同源 (Zhao et al., 2017b)。Tong 等 (2018) 发现茶树中 34.9% 的 circRNA 与 PlantcircBase 数据库的 circRNA 序列存在同源关系。也有研究发现玉米 2 804 个 circRNA 与水稻和拟南芥分别仅有 47 个和 3 个保守, 保守性极低 (Chen et al., 2018)。

2.3 植物 circRNA 类型

植物 circRNA 种类丰富, 根据来源可分为多种类型, 包括: (1) 外显子来源的 circRNA: 由来源于线性转录体的同一条意义链中一个或多个外显子形成 (Salzman et al., 2012); (2) 内含子来源的 circRNA: 由线性转录体的内含子环化形成 (Zhang et al., 2013); (3) 外显子—内含子来源的 circRNA: 由外显子与保留在外显子之间的内含子形成 (Salzman et al., 2013); (4) 基因间区 circRNA: 来源于线性转录体上与内含子或外显子相隔 1 kb 以上的基因间隔区域; (5) 反义链 circRNA: 来源于线性转录体的反义链的 1 个或多个外显子。不同物种间各种类型的 circRNA 所占比例不一致。水稻、拟南芥和番茄中外显子类型的 circRNA 占比例最大 (Lu et al., 2015; Ye et al., 2015; Chen et al., 2017; Wang et al., 2017a), 而猕猴桃、小麦、大豆和马铃薯中, 基因间区类型 circRNA 比例最大 (Wang et al., 2017b, 2017c; Zhao et al., 2017b; Zhou et al., 2018b)。此外, 马铃薯中还鉴定出 200 个 (9.53%) 长链非编码 RNA 来源的 circRNA, 是植物中首次报道该类型的 circRNA (Zhou et al., 2017)。Lu 等 (2015) 将从水稻中鉴定出的 2 354 个 circRNA 进行更加细致地划分, 其中外显子—外显子最多, 其次落在基因间区, 其余落在 5'非翻译区—外显子、5'非翻译区—5'非翻译区、外显子—3'非翻译区、3'非翻译区—3'非翻译区、外显子—基因间区、3'非翻译区—基因间区、内含子区域、非编码 RNA 区域及很小部分落到两个基因或者其他区域 (Lu et al., 2015)。

2.4 植物 circRNA 的可变剪接现象

线性 mRNA 在剪接过程中存在可变剪接事件, 大致分为 5 种, 包括外显子跳跃、外显子选择、可变的 5'端选择位点、可变的 3'端选择位点和内含子保留 (Stamm et al., 2005)。植物 circRNA 同样可以在同一基因座产生多种可变剪接体, 一般分为两种类型, 可变反向剪接环化和可变剪接环化 (Lu et al., 2015; Tan et al., 2017; Ye et al., 2017a)。可变反向剪接环化, 即同一基因产生不同反向剪接位点。可变剪接环化则为具备同一剪接位点, 但剪接位点之间的转录本长度不同。番茄中高叶绿素含量基因 (*DET1*) 和 15-顺式- ζ -胡萝卜素异构酶基因 (*ZISO*) 分别在一个剪接位点鉴定出 3 种和 2 种可变剪接环化体。高叶绿素含量基因 (*DET1*)、*Squamosa* 启动子结合蛋白基因 (*SPL12*) 和八氢番茄红素合成酶 1 基因 (*PSY1*) 分别鉴定出 2、2、3 种可变剪接位点 (Tan et al., 2017)。此外, 来源八氢番茄红素合成酶 1 基因的 3 个 circRNA 在番茄成熟进程中的表达趋势存在差异, 暗示它们之间存在功能差异 (Tan et al., 2017)。

circRNA 的可变剪接是非常普遍的现象。Ye 等 (2017a) 报道水稻中 1 733 个 circRNA 仅来源于 196 个基因座。Lu 等 (2015) 报道水稻中 486 个外显子类型的 circRNA 共来源于 175 个基因。另外, 来源于基因间区的 circRNA “Os10circ03574” 在同一剪接位点共发现 7 种可变剪接体。其中在叶片中发现 2 种, 花粉中发现 6 种, 表明植物中 circRNA 的可变剪接存在组织特异性 (Lu et al., 2015)。猕

猕猴桃中共发现 163 个可变剪接事件,其中可变的 3'端选择位点类型的可变反向剪接环化事件最为普遍,且大部分的可变剪接事件发生在来源于蛋白质编码基因的 circRNA 中 (Wang et al., 2017c)。Zhao 等 (2017b) 在大豆中发现 43 个可变剪接事件,且发生可变剪接事件的基因倾向含有更多的外显子。

2.5 植物 circRNA 的侧翼内含子特征

circRNA 的形成由顺式作用元件和反式作用因子共同决定。研究表明 circRNA 成环区域侧翼内含子序列对其形成至关重要,且长度一般较长 (Jeck et al., 2013; Ashwal-Fluss et al., 2014)。与人类 (Jeck et al., 2013) 和秀丽隐杆线虫 (Ivanov et al., 2015) 研究结果类似,水稻、拟南芥 (Ye et al., 2015)、棉花 (Zhao et al., 2017a) 和玉米 (Chen et al., 2018) 中 circRNA 侧翼内含子的长度远大于线性 RNA。动物中成环外显子的侧翼内含子中显著富集 ALU 重复序列和反向互补序列,可以通过互补配对促进外显子的环化 (Jeck et al., 2013; Liang & Wilusz, 2014; Zhang et al., 2014; Ivanov et al., 2015)。但是,水稻中成环外显子的侧翼内含子几乎不存在重复和反向互补序列 (Lu et al., 2015; Ye et al., 2015),也没有发现序列相似性或保守结构域 (Ye et al., 2015)。棉花中仅 10.35% 的外显子 circRNA 中存在反向互补序列 (Zhao et al., 2017a)。因此“内含子配对驱动的环化”可能不是植物中 circRNA 形成的主要机制。但是也有研究表明,拟南芥中内含子区域和剪接信号位点附近存在有限的互补序列,大多数互补序列范围 4~11 个核苷酸,远远短于动物 (Sun et al., 2016)。另外在玉米中发现 circRNA 成环序列的侧翼内含子富集 LINE1 - 类似元件转座元件和其反补序列,证明了转座元件在玉米的成环过程中起重要作用,这与“内含子配对驱动的环化”机制 (Chen et al., 2018) 一致。

更长的内含子可能携带更多的短反向重复序列或者其他未发现的结构特征以助成环。此外,长的侧翼内含子序列增加了相邻外显子之间的距离,可能不利于线性拼接。总之,植物中 circRNA 形成机制尚未明确,需要进一步的试验证据揭示成环机理。

2.6 植物 circRNA 的 GT/AG 典型及非典型剪接信号

生物存在 U2 和 U12 依赖型两种剪接体 (Will et al., 1999)。U2 依赖的剪接体负责植物和动物基因组中的大多数剪接,在内含子 5'和 3'末端分别存在供体位点“GT”和受体位点“AG”。人类 (Jeck & Sharpless, 2014; Starke et al., 2015; Szabo et al., 2015) 和果蝇 (Westholm et al., 2014) 中 circRNA 大多依赖于典型的剪接位点,即 GT/AG 剪接信号。但在植物中存在差异,Sun 等 (2016) 报道拟南芥中 803 个 circRNA 为典型剪接信号 GT/AG,只有 9 个为非 GT/AG 剪接信号。棉花 circRNA 中存在非典型的 GT/AG 剪接信号,但只占 0.9%~1.3% (Zhao et al., 2017a)。另外,也有报道推测植物 circRNA 的形成可能不是主要取决于典型的 GT/AG 剪接信号,如 Ye 等 (2017a) 在水稻中鉴定出的 2 806 个 circRNA 中,只有 206 个 (7.3%) circRNA 侧翼剪接信号为 GT/AG (CT/AC)。

3 植物 circRNA 的调控作用及可能的作用机制

在动物中的大量研究表明 circRNA 参与广泛的生物学过程。目前植物 circRNA 研究主要集中在预测及其验证工作,而功能机制研究尚处于起步阶段,对 circRNA 在植物体的调节作用鲜有报道。

3.1 植物 circRNA 时空表达特异性

植物 circRNA 存在时空表达特异性,暗示其分布可能决定其细胞和组织的功能特异性,参与基因调控并影响组织的发育。Lu 等 (2015) 比较了水稻中 30 个 circRNA 在叶片和花序之间的表达,发

现 16 个在叶片和花序等量表达, 5 个在叶中高表达, 2 个在花序中高表达, 3 个在花序中特异性表达, 4 个在叶中特异表达。猕猴桃的根、茎和叶中具有不同数量和类型的 circRNA, 其中在 3 种组织中共同表达的 circRNA 仅占 17.97%, 而各组织中特异表达的占 59.67% (Wang et al., 2017c)。大豆中的 circRNA 在根系、茎和叶片中共同存在的比例仅占 2.7%, 而 3 种组织中特异表达的分别为 49.3%、30.6%和 9.0%, 且 circRNA 在不同组织中表现出特异性表达模式 (Zhao et al., 2017b)。另外, 在拟南芥中叶绿体 circRNA 的数量多于线粒体, 暗示 circRNA 可能参与植物的光合作用 (Sun et al., 2016)。

Chen 等 (2017) 发现拟南芥 10 个 circRNA 在不同时期存在不同的表达丰度, 与生长期相比, 成熟期有 6 个 circRNA 差异表达 (5 个上调, 1 个下调), 与成熟期相比, 衰老期有 35 个 circRNA 差异表达 (34 个上调, 1 个下调)。circRNA 在成熟衰老过程中的上调表达趋势暗示 circRNA 可能在叶片衰老阶段发挥重要作用 (Liu et al., 2017)。在茶树中, 叶芽和幼叶之间比较, 共发现 604 个差异表达的 circRNA, 且差异表达的 circRNA 主要富集在叶绿体相关的 GO 术语和光合作用/代谢物合成相关的 KEGG 途径中 (Tong et al., 2018)。在樱桃番茄 ‘金陵粉玉’ 和 ‘金陵美玉’ 中, 与绿熟期相比, 转色期分别发现 273 个和 89 个差异表达的 circRNA, 且差异表达 circRNA 的来源基因富集在代谢、细胞和单组织过程等生物学过程, 及催化活性和结合分子等功能 (Zhou et al., 2018a)。另外, 番茄绿熟期和成熟期共发现 340 个差异表达的 circRNA, 推测 circRNA 可能通过代谢适应, 激素平衡和光合作用相关途径参与调控果实成熟 (Yin et al., 2018)。

3.2 植物 circRNA 非生物及生物胁迫响应

多项研究表明, circRNA 在非生物胁迫下会发生差异表达。例如, 磷胁迫下共有 27 个水稻外显子类型 circRNA 的表达量发生差异变化 (Ye et al., 2015)。甜椒果实在冷胁迫下共有 36 个 circRNA 差异表达 (Zuo et al., 2018)。小麦幼苗在脱水胁迫下有 62 个 circRNA 差异表达, 且来源基因主要富集在光合作用、叶啉和叶绿素代谢、氧化磷酸化、氨基酸生物合成和代谢以及植物激素信号转导等生物学途径 (Wang et al., 2017b); 梨中则发现 33 个 circRNA 在脱水胁迫后差异表达, 且其中 11 个来源基因参与氧化还原过程 (Wang et al., 2018a)。番茄中发现 163 个 circRNA 响应寒冷胁迫, 其中 138 个上调, 25 个下调 (Zuo et al., 2016)。Pan 等 (2018) 在拟南芥中发现与热胁迫应急相关的 1 583 个 circRNA, 并且在热胁迫环境下 circRNA 的长度及外显子环化数量增加, 可变剪接事件也有所增加 (Pan et al., 2018)。此外, 拟南芥在弱光和强光胁迫后, 以及大麦用微量元素铁和锌处理时, 均显示出 circRNA 明显的差异表达变化 (Ye et al., 2015; Darbani et al., 2016)。

circRNA 同样响应生物胁迫。在猕猴桃中发现 circRNA 对病原体入侵具有特异性响应 (Wang et al., 2017c)。在马铃薯中, 429 个差异表达 circRNA 响应肉毒杆菌巴西亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*) 感染 (Zhou et al., 2018b)。棉花感染黄萎病后共发现 280 个差异表达的 circRNA, 这些差异表达的 circRNA 的来源基因主要富集在 “刺激反应” (stimulus response), 并且易感病株系中差异表达的 circRNA 数约为抗病株系的两倍 (Xiang et al., 2018)。Ghorbani 等 (2018) 比较伊朗花叶病毒侵染玉米植株叶片与未侵染植株叶片之间共有的 circRNA, 发现 160 个发生差异表达, 其中 155 个上调, 5 个下调。Wang 等 (2018b) 发现番茄叶片感染黄化曲叶病毒病与对照之间分别有 32 和 83 个 circRNA 特异表达, 且感染病毒后 circRNA 的表达量低于对照。这些结果表明 circRNA 响应并可能参与调控非生物和生物胁迫, 在植物发育中发挥重要作用, 但是, 这需要过表达或者敲除试验等证据进一步证实。

3.3 植物 circRNA 参与调节其来源基因的转录

circRNA 与来源基因表达量之间的相关性报道不一。在拟南芥中发现的 27 个磷胁迫响应 circRNA 中, 有 11 个与其来源基因的表达量呈显著正相关 (Ye et al., 2015)。茶树中 circRNA 与来源基因的表达量之间总体呈现正相关关系 (Tong et al., 2018)。Wang 等 (2018b) 发现番茄叶片中 Slcirc108 及其来源基因 *Soly07g043420.2* 在感染黄化曲叶病毒病后均下调, 而 Slcirc017 及其来源基因 *Soly01g080200.2* 均上调。Liu 等 (2017) 则发现拟南芥叶片在生长、成熟到衰老过程中上调表达的 circRNA 并没有伴随着来源基因表达量的上调。同样在拟南芥叶片中, Meng 等 (2018) 发现外显子类型 circRNA 中仅 7.68% 与其来源基因的表达量之间呈现显著正相关。玉米中 circRNA 表达量低, 但是来源基因却有着高表达水平, 且两者的表达并没有显著相关性 (Chen et al., 2018)。另外, 猕猴桃中外显子类型 circRNA 和内含子类型 circRNA 分别有 15.33% 和 19.64% 与其来源基因的表达量呈现显著正相关, 但同时也有 8.33% 和 5.19% 的比例呈显著负相关 (Wang et al., 2017c)。在大麦中也发现 circRNA 和来源线性基因的表达量之间有 3 种结果, 正相关、无相关关系和负相关关系 (Darbani et al., 2016)。

有报道通过转基因技术证明 circRNA 过表达可以影响其来源基因的转录 (图 1)。水稻中过表达 circRNA Os08circ16564 可以减少其来源基因的表达水平 (Lu et al., 2015)。在番茄中过表达来自八氢番茄红素合成酶 1 (PSY1) 基因的 circRNA, 后代株系呈现一定比例的黄色果实。黄色果实中的番茄红素和 β -胡萝卜素的积累量显著下降, 进一步研究转基因株系中 *PSY1* 的 mRNA 表达发生下调。此外, 过表达来源于八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 基因的 circRNA 出现相似表型 (Tan et al., 2017)。这项研究表明过表达 circRNA 后, 能够下调对应的线性 mRNA 表达量, 并可能是导致转基因株系出现异常表型的原因。过表达拟南芥 *SEPALLATA3* (*SEP3*) 基因第 6 个外显子形成的 1 个 circRNA, 可导致花器官表现更少的雄蕊和更多的花瓣, 这与直接过表达 *SEP3.3* (缺少外显子 6) 表型一致。进一步研究发现, 来源于 *SEP3* 基因第 6 个外显子形成的 circRNA 可与其 DNA 座形成 R-loop, 并增加可变剪接体 *SEP3.3* 的表达 (Conn et al., 2017) (图 1)。但是, 与其来源 DNA 座形成 R-loop 是否是植物中 circRNA 的主要作用方式仍需要试验支持。

3.4 circRNA 参与调节 miRNA 的形成

植物 circRNA 可具有与来源基因完全不同的功能, 作为调节下游基因的独立调控分子。miRNA 通常由 RNA 聚合酶 II 转录, 最初产物为具有帽子结构和多聚腺苷酸尾巴 (AAAAA) 的 pri-miRNA 前体物, DCL1/HYL1 复合体则负责 miRNA 前体的进一步剪切 (Kurihara et al., 2006)。内含子套索 RNA 是线性 mRNA 剪接的副产品, 通常很快被 RNA 脱支酶 1 (DRB1) 降解。拟南芥内含子套索脱支酶 DBR1 (LARIAT DEBRANCHING ENZYME 1) 基因发生突变后, 内含子套索 RNA 积累, 可与 DCL1/HYL1 剪切复合体竞争结合 pri-miRNAs, 最终减少 miRNA 的形成 (Li et al., 2016)。过表达拟南芥 *At5g37720* 第 1 个内含子形成的套索 RNA 可以引起多重表型, 且过表达植株中 miR159 和 miR167 表达量下降, 也暗示着套索 RNA 的积累和 miRNA 的形成具有拮抗现象 (Li et al., 2016)。进一步研究发现, 过表达植株的多重表型包括叶子卷曲和簇生, 开花晚及生育力下降, 并伴随着 800 个基因表达量的变化。其中, 具有调节开花时间关键作用的 *FT* 基因的表达水平在套索 RNA 过表达植株中显著降低, 可能是导致晚花表型出现的原因 (Cheng et al., 2018)。由于过表达 17 个套索 RNA 后, 只有 1 个即来源 *At5g37720* 第 1 个内含子形成的套索 RNA 的植株观察到与野生型的形态学表型明显差异 (Cheng et al., 2018), 因此, 单一套索 RNA 的具体功能机制仍需要进一步验证。

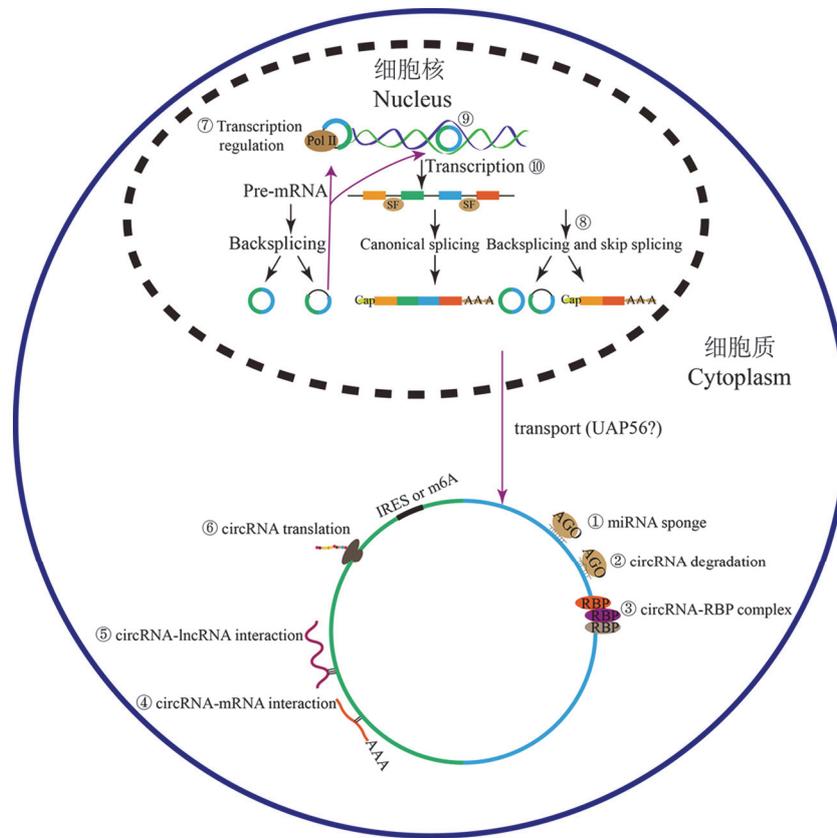


图 1 circRNA 的形成和功能[参考 Conn 等 (2017) 和 Panda 等 (2017) 的报道并补充修改]

形成: 细胞核内——①circRNA 的形成伴随着外显子跳跃事件的发生; ②前体 mRNA 可以单独形成 circRNA, 也可单独形成 mRNA; ③circRNA 的形成受到剪切蛋白的调控。

功能: 细胞质内 (从顺时针方向开始)——①circRNA 可以竞争结合 miRNA, 作为 miRNA 海绵, 间接调控基因的表达; ②miRNA 可能参与 circRNA 的降解; ③circRNA 可能与 RNA 结合蛋白 (RBPs) 结合, 影响 circRNA 本身的定位和功能, 影响与 RBPs 相互作用的 mRNAs 或者可以作为多蛋白复合物组装的平台; ④circRNA 与 mRNA 相互作用可能影响 mRNA 的翻译; ⑤circRNA 与线性长非编码 RNA (lncRNA) 的相互作用可能影响 lncRNA 功能; ⑥携带 6-甲基腺嘌呤 (m6A) 或者核糖体识别位点 (IRES) 的 circRNA 可以用作翻译模板。细胞核内——⑦内含子类型 circRNA (ciRNA) 和外显子-内含子类型 circRNA (EliciRNA) 与延伸的 RNA 聚合酶 II 结合并促进转录; ⑧circRNA 的形成可以与 mRNA 形成竞争; ⑨circRNA 可与 DNA 形成 R-loop 环, 从而影响来源基因的可变剪接 (Conn et al., 2017); ⑩circRNA 可能与单链或双链 DNA 相互作用影响 DNA 复制或者转录。

Fig. 1 The biogenesis and functions of circRNA

Biogenesis: in the nucleus——① circRNAs production can be directly coupled to exon skipping; ② Pre-mRNA can produce a mature circRNA or a mature mRNA; ③ The generation of circRNA is regulated by the spliceosome.

Function: in the cytoplasm(From top clockwise)——① CircRNAs compete for binding of miRNAs, thus serving as miRNA sponges, and indirectly control the gene expression; ② miRNA-mediated cleavage may be one of the ways which circRNAs are degraded; ③ circRNAs may associate with RNA-binding proteins (RBPs) and influence the fate of the circRNAs localization and function, impact the mRNAs function that the RBPs interact with, or perhaps serve as a platform for the assembly of multiprotein complexes; ④ Interaction of circRNAs with mRNAs may impact mRNA translation; ⑤ The interaction of circRNAs with linear long noncoding RNAs (lncRNAs) may affect lncRNA functions; ⑥ circRNAs possessing m6A (N6-methyladenosine) modification or IRES (Internal Ribosomal Entry Site) elements may translate proteins. In the nucleus——⑦ Circular intronic (ciRNA) and Exon-Intron-circular RNAs (EliciRNA) bind to RNA Pol II and promote transcription; ⑧ circRNA production may compete against the accumulation of the linear mRNA; ⑨ circRNA may regulate splicing of its cognate mRNA through R-loop formation; ⑩ circRNAs may also interact with single-stranded or double-stranded DNA, with a potential impact on DNA replication or transcription.

3.5 植物 circRNA 吸附 miRNA 的能力

动物中已有多项研究证明 circRNA 可以吸附 miRNA, 进而上调其靶基因的表达 (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013), 但有研究指出, 只有少数 circRNA 具有发挥 miRNA 海绵吸附作用的条件 (Guo et al., 2014)。虽然 Lu 等 (2015) 研究过表达水稻 *circRNAOs08circ16564* 后发现, 具有靶标关系的 *OsmiR172* 的表达水平并没有出现变化, 一些植物 circRNA 的研究仍将 circRNA 作为潜在的 miRNA 海绵进行分析。例如, Wang 等 (2017b) 在小麦中发现 6 个 circRNA 可以作为 26 个 miRNA 的潜在靶标。Zuo 等 (2016) 在番茄中报道 102 个 circRNA 可以作为 24 个 miRNA 的潜在靶标。伊朗花叶病毒侵染玉米后共有 33 个差异 circRNA 可以和 23 个 miRNA 序列互补 (Ghorbani et al., 2018)。Wang 等 (2017a) 比较野生型和乙烯信号转录因子 (LeERF1) 转基因番茄果实发现 61 个 circRNA 可能具有吸附 miRNA 的作用, 且其中的一些 miRNA 参与乙烯信号通路。枸橘早花突变体与野生型相比, 共发现 176 个差异表达的 circRNA, 其中 29 个 circRNA 可以作为 16 个 miRNA 的潜在靶标 (Zeng et al., 2018)。但是截止目前, 具有潜在吸附能力的 circRNA 在不同植物物种中所占比例较小。例如, Ye 等 (2015) 报道拟南芥和水稻中仅少部分的 circRNA (5.0%和 6.6%) 可以被预测为 miRNA 的潜在靶标 (Ye et al., 2015), Chen 等 (2017) 则在拟南芥中发现更低比例, 为 0.67%。Yin 等 (2018) 在熟绿和成熟番茄两个发育时期中共鉴定出差异表达的 circRNA 340 个, 其中仅 19 个预测为 miRNA 的潜在靶标。Wang 等 (2018b) 在番茄叶片中共鉴定出 184 个 circRNA, 但没有发现可以与之有吸附作用的 miRNA。

另一方面, 目前 circRNA 及 miRNA 在不同植物物种中的鉴定尚不全面。如枸橘、辣椒、大麦和小麦的 circRNA 鉴定数量仍然较少, 且 miRBase 数据库中仅收录玉米成熟 miRNA 325 条, 拟南芥成熟 miRNA 430 条, 但人类已达到 2 693 条。这可能掩盖了 circRNA 和 miRNA 之间在植物中的吸附或靶切关系, 因此需要在将来的研究中进一步发掘验证。

4 展望

在过去的 5 年中, 植物 circRNA 的研究取得了一定进展。在动物中研究发现 circRNA 在转录水平和转录后水平均发挥重要功能, 但在植物中是否存在一致或者相似的功能仍然需要试验验证。今后有关植物 circRNA 的研究可能集中在以下两个方面:

(1) 植物 circRNA 的形成、定位、运输及其降解作用机制。与动物 circRNA 的形成及其作用机制研究相比, 植物 circRNA 的形成及其作用机制基本处于未知状态, 如植物 circRNA 生成的调控过程仍然是迫切要解决的问题, 植物 circRNA 如何从细胞核转运到细胞质, 是否能够长距离运输, 植物 circRNA 有怎样的降解机制等。

(2) 植物 circRNA 的功能鉴定。circRNA 广泛分布在不同的植物物种中, 并显示出显著的组织胁迫特异性表达模式, 表明 circRNA 可能在植物物种的生长发育及在生物胁迫和非生物胁迫胁迫调控中起着重要的作用, 但具体的功能及其机制尚未有明确报道。未来对植物生物胁迫、非生物胁迫及生长发育过程中 circRNA 的生物学功能研究可能会扩大作物在抗逆性、产量和品质的选择范围。另外, 动物中已有确切证据证明一些 circRNA 可以翻译蛋白质并发挥重要功能, 植物 circRNA 是否具备翻译功能性肽段的功能需要进一步的研究。虽然有报道证明植物 circRNA 参与调节其亲本基因转录, 但远不能全面揭示 circRNA 在植物体内存在的生物学功能, 是否存在其他功能及机制需要进一步挖掘和证明。

References

- Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N R, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. 2014. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 56: 55 - 66.
- Chen G, Cui J W, Wang L, Zhu Y F, Lu Z G, Jin B. 2017. Genome-wide identification of circular RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1678.
- Chen L, Yu Y Y, Zhang X C, Liu C, Ye C Y, Fan L J. 2016. PeircRNA_finder: a software for circRNA prediction in plants. *Bioinformatics*, 32: 3528 - 3529.
- Chen L, Zhang P, Fan Y, Lu Q, Li Q, Yan J B, Muehlbauer G J, Schnable P S, Dai M Q, Li L. 2018. Circular RNAs mediated by transposons are associated with transcriptomic and phenotypic variation in maize. *New Phytologist*, 217: 1292 - 1306.
- Cheng J P, Zhang Y, Li Z W, Wang T Y, Zhang X T, Zheng B L. 2018. A lariat-derived circular RNA is required for plant development in *Arabidopsis*. *Science China Life Sciences*, 61: 204 - 213.
- Chu Q J, Shen E H, Ye C Y, Fan L J, Zhu Q H. 2018. Emerging roles of plant circular RNAs. *Journal of Plant Cell*, 1: 1 - 14.
- Chu Q J, Zhang X C, Zhu X T, Liu C, Mao L F, Ye C Y, Zhu Q H, Fan L J. 2017. PlantcircBase: a database for plant circular RNAs. *Molecular Plant*, 10: 1126 - 1128.
- Conn V M, Hugouvieux V, Nayak A, Conos S A, Capovilla G, Cildir G, Jourdain A, Tergaonkar V, Schmid M, Zubietta C, Conn S J. 2017. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nature Plants*, 3: 17053.
- Darbani B, Noeparvar S, Borg S. 2016. Identification of circular RNAs from the parental genes involved in multiple aspects of cellular metabolism in barley. *Frontiers in Plant Science*, 7: 776.
- Gao Y, Wang J F, Zhao F Q. 2015. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome Biology*, 16: 4.
- Gao Y, Zhang J Y, Zhao F Q. 2017. Circular RNA identification based on multiple seed matching. *Briefings in Bioinformatics*, 19: bbx014.
- Ghorbani A, Izadpanah K, Peters J R, Dietzgen R G, Mitter N. 2018. Detection and profiling of circular RNAs in uninfected and maize Iranian mosaic virus-infected maize. *Plant Science*, 274: 402 - 409.
- Guo J U, Agarwal V, Guo H, Bartel D P. 2014. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, 15: 409.
- Hansen T B. 2018. Improved circRNA identification by combining prediction algorithms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6: 20.
- Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, Bramsen J B, Finsen B, Damgaard C K, Kjems J. 2013. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 495: 384 - 388.
- Hansen T B, Venø M T, Damgaard C K, Kjems J. 2016. Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Research*, 44: e58.
- Hoffmann S, Otto C, Doose G, Tanzer A, Langenberger D, Christ S, Kunz M, Holdt L M, Teupser D, Hackermüller J, Stadler P F. 2014. A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biology*, 15: R34.
- Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath H T, Orejuela M R, Piechotta M, Levanon E Y, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. 2015. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Reports*, 10: 170 - 177.
- Jeck W R, Sharpless N E. 2014. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nature Biotechnology*, 32: 453 - 461.
- Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, Slevin M K, Burd C E, Liu J, Marzluff W F, Sharpless N E. 2013. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 19: 141 - 157.
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA-a Publication of the RNA Society*, 12: 206 - 212.
- Lee S M, Kong H G, Ryu C M. 2017. Are circular RNAs new kids on the block? *Trends in Plant Science*, 22: 357 - 360.
- Li Z, Wang S P, Cheng J P, Su C B, Zhong S X, Liu Q, Fang Y D, Yu Y, Lv H, Zheng Y, Zheng B L. 2016. Intron lariat RNA inhibits microRNA biogenesis by sequestering the dicing complex in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 12: e1006422.
- Liang D, Wilusz J E. 2014. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes & Development*, 28: 2233 - 2247.
- Liu T F, Zhang L, Chen G, Shi T L. 2017. Identifying and characterizing the circular RNAs during the lifespan of *Arabidopsis* leaves. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1278.

- Lu T T, Cui L L, Zhou Y, Zhu C R, Fan D L, Gong H, Zhao Q, Zhou C C, Zhao Y, Lu D F, Luo J H, Wang Y C, Tian Q L, Feng Q, Huang T, Han B. 2015. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA*, 21: 2076 - 2087.
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak S D, Gregersen L H, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. 2013. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495: 333 - 338.
- Meng X, Zhang P, Chen Q, Wang J, Chen M. 2018. Identification and characterization of ncRNA-associated ceRNA networks in *Arabidopsis* leaf development. *BMC Genomics*, 19: 607.
- Pan T, Sun X Q, Liu Y X, Li H, Deng G B, Lin H H, Wang S H. 2018. Heat stress alters genome-wide profiles of circular RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 96: 217 - 229.
- Panda A C, Grammatikakis I, Munk R, Gorospe M, Abdelmohsen K. 2017. Emerging roles and context of circular RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8: e1386.
- Salzman J, Chen R E, Olsen M N, Wang P L, Brown P O. 2013. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genetics*, 9: e1003777.
- Salzman J, Gawad C, Wang P L, Lacayo N, Brown P O. 2012. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS ONE*, 7: e30733.
- Sanger H L, Klotz G, Riesner D, Gross H J, Kleinschmidt A K. 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73: 3852 - 3856.
- Shen Y D, Guo X W, Wang W M. 2017. Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish. *Febs Letters*, 591: 213 - 220.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y S, Zhang Z Y, Toiber D, Thanaraj T A, Soreq H. 2005. Function of alternative splicing. *Gene*, 344: 1 - 20.
- Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung L H, Bindereif A. 2015. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Reports*, 10: 103 - 111.
- Sun X Y, Wang L, Ding J C, Wang Y R, Wang J S, Zhang X Y, Che Y L, Liu Z W, Zhang X R, Ye J Z, Wang J, Sablok G, Deng Z P, Zhao H W. 2016. Integrative analysis of *Arabidopsis thaliana* transcriptomics reveals intuitive splicing mechanism for circular RNA. *Febs Letters*, 590: 3510 - 3516.
- Suzuki H, Tsukahara T. 2014. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 9331 - 9342.
- Szabo L, Morey R, Palpant N J, Wang P L, Afari N, Jiang C, Parast M M, Murry C E, Laurent L C, Salzman J. 2015. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biology*, 16: 126.
- Tan J J, Zhou Z J, Niu Y J, Sun X Y, Deng Z P. 2017. Identification and functional characterization of tomato circRNAs derived from genes involved in fruit pigment accumulation. *Scientific Reports*, 7: 8594.
- Tong W, Yu J, Hou Y, Li F, Zhou Q, Wei C, Bennetzen J L. 2018. Circular RNA architecture and differentiation during leaf bud to young leaf development in tea (*Camellia sinensis*). *Planta*, 248: 1417 - 1429.
- Wang J X, Lin J, Wang H, Li X G, Yang Q S, Li H, Chang Y H. 2018a. Identification and characterization of circRNAs in *Pyrus betulifolia* Bunge under drought stress. *PLoS ONE*, 13: e0200692.
- Wang J Y, Yang Y W, Jin L M, Ling X T, Liu T L, Chen T Z, Ji Y H, Yu W G, Zhang B L. 2018b. Re-analysis of long non-coding RNAs and prediction of circRNAs reveal their novel roles in susceptible tomato following TYLCV infection. *BMC Plant Biology*, 18: 104.
- Wang K, Singh D, Zeng Z, Coleman S J, Huang Y, Savich G L, He X, Mieczkowski P, Grimm S A, Perou C M, MacLeod J N, Chiang D Y, Prins J F, Liu J. 2010. MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. *Nucleic Acids Research*, 38: e178.
- Wang P L, Bao Y, Yee M C, Barrett S P, Hogan G J, Olsen M N, Dinneny J R, Brown P O, Salzman J. 2014. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS ONE*, 9: e90859.

- Wang Y X, Wang Q, Gao L P, Zhu B Z, Luo Y B, Deng Z P, Zuo J H. 2017a. Integrative analysis of circRNAs acting as ceRNAs involved in ethylene pathway in tomato. *Physiol Plantarum*, 161: 311 - 321.
- Wang Y X, Yang M, Wei S M, Qin F J, Zhao H J, Suo B. 2017b. Identification of circular RNAs and their targets in leaves of *Triticum aestivum* L. under dehydration stress. *Frontiers in Plant Science*, 7: 2024.
- Wang Z P, Liu Y F, Li D W, Li L, Zhang Q, Wang S B, Huang H W. 2017c. Identification of circular RNAs in kiwifruit and their species-specific response to bacterial canker pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 8: 413.
- Westholm J O, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, Celniker S E, Graveley B R, Lai E C. 2014. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Reports*, 9: 1966 - 1980.
- Will C L, Schneider C, Reed R, Luhrmann R. 1999. Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes. *Science*, 284: 2003-2005.
- Xiang L X, Cai C W, Cheng J R, Wang L, Wu C F, Shi Y Z, Luo J Z, He L, Deng Y S, Zhang X, Yuan Y L, Cai Y F. 2018. Identification of circularRNAs and their targets in *Gossypium* under Verticillium wilt stress based on RNA-seq. *Peer J*, 6: e4500.
- Ye C Y, Chen L, Liu C, Zhu Q H, Fan L. 2015. Widespread noncoding circular RNAs in plants. *New Phytologist*, 208: 88 - 95.
- Ye C Y, Zhang X C, Chu Q J, Liu C, Yu Y Y, Jiang W Q, Zhu Q H, Fan L J, Guo L B. 2017a. Full-length sequence assembly reveals circular RNAs with diverse non-GT/AG splicing signals in rice. *RNA Biology*, 14: 1055 - 1063.
- Ye J Z, Wang L, Li S Z, Zhang Q R, Zhang Q L, Tang W H, Wang K, Song K, Sablok G, Sun X Y, Zhao H W. 2017b. AtCircDB: a tissue-specific database for *Arabidopsis* circular RNAs. *Briefings in Bioinformatics*: bbx089.
- Yin J L, Liu M Y, Ma D F, Wu J W, Li S L, Zhu Y X, Han B. 2018. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 136: 90 - 98.
- Zeng R F, Zhou J J, Hu C G, Zhang J Z. 2018. Transcriptome-wide identification and functional prediction of novel and flowering-related circular RNAs from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) . *Planta*, 247: 1191 - 1202.
- Zhang P J, Meng X W, Chen H J, Liu Y J, Xue J T, Zhou Y C, Chen M. 2017. PlantCircNet: a database for plant circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks. *Database*, 2017: bax089.
- Zhang X O, Dong R, Zhang Y, Zhang J L, Luo Z, Zhang J, Chen L L, Yang L. 2016. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Research*, 26: 1277 - 1287.
- Zhang X O, Wang H B, Zhang Y, Lu X, Chen L L, Yang L. 2014. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 159: 134 - 147.
- Zhang Y, Zhang X O, Chen T, Xiang J F, Yin Q F, Xing Y H, Zhu S, Yang L, Chen L L. 2013. Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular Cell*, 51: 792 - 806.
- Zhao T, Wang L, Li S, Xu M, Guan X Y, Zhou B L. 2017a. Characterization of conserved circular RNA in polyploid *Gossypium* species and their ancestors. *Febs Letters*, 591: 3660 - 3669.
- Zhao W, Cheng Y H, Zhang C, You Q B, Shen X J, Guo W, Jiao Y Q. 2017b. Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean. *Scientific Reports*, 7: 5636.
- Zhou R, Xu L P, Zhao L P, Wang Y L, Zhao T M. 2018a. Genome-wide identification of circRNAs involved in tomato fruit coloration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499: 466 - 469.
- Zhou R, Zhu Y, Zhao J, Fang Z, Wang S, Yin J, Chu Z, Ma D. 2017. Transcriptome-wide identification and characterization of potato circular RNAs in response to *Pectobacterium carotovorum* subspecies *brasiliense* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 71.
- Zhou R, Zhu Y X, Zhao J, Fang Z W, Wang S P, Yin J L, Chu Z H, Ma D F. 2018b. Transcriptome-wide identification and characterization of potato circular RNAs in response to *Pectobacterium carotovorum* subspecies *brasiliense* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 71.
- Zuo J H, Wang Q, Zhu B Z, Luo Y B, Gao L P. 2016. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479: 132 - 138.
- Zuo J H, Wang Y X, Zhu B Z, Luo Y, Wang Q, Gao L P. 2018. Analysis of the coding and non-coding RNA transcriptomes in response to bell pepper chilling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 2001.