

· 药学基础 ·

## 响应内生真菌侵染的地黄 miR166 家族鉴定及胁迫下的表达分析

朱昀昊, 许姣, 张梦佳, 董诚明, 时博\*

(河南中医药大学药学院, 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:为了鉴定地黄 miR166 基因家族的成员,明确其家族成员在逆境下的响应模式。方法:采用高通量测序技术获得小 RNA 数据库,筛选地黄 miR166 家族成员,利用 RNAfold 分析其前体结构, DNAMAN 和 MEGA 分别进行保守性和进化性分析;采用 TargetFinder 软件预测地黄 miR166 家族成员的靶基因;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分析其家族成员在响应非生物胁迫中的表达模式。结果:鉴定到 5 条 miR166,前体都具有完整的茎环结构;序列比对结果显示前体和成熟体保守性均较高;预测到 48 个 miR166 的靶基因,主要注释到 HD-ZIP III 家族转录因子;表达特性分析表明,地黄经过内生真菌侵染后,miR166 均呈上调表达,在非生物胁迫下其家族成员的表达情况不同,其中 rgl-miR166b-5p 在早涝处理组及高低温处理中表达量分别都较空白组显著下调,与在内生真菌侵染下表达模式相反。结论:该研究结果初步明确了地黄 miR166 家族在响应生物胁迫和非生物胁迫下的表达模式,为地黄今后育种改良及相关研究提供理论依据。

**[关键词]** 地黄; miR166; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR); 胁迫; 表达

**[中图分类号]** R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0133-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221618

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221109.1857.002.html>

**[网络出版日期]** 2022-11-10 8:45

### Identification of *Rehmannia glutinosa* miR166 Family in Response to Endophytic Fungal Infection and Expression Analysis Under Stresses

ZHU Yunhao, XU Jiao, ZHANG Mengjia, DONG Chengming, SHI Bo\*

(School of Pharmacy, Respiratory Disease Diagnosis and Treatment and New Drug of Henan Collaborative Innovation Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the members of the *Rehmannia glutinosa* miR166 gene family and clarify the response mode under adversity. **Method:** High-throughput sequencing technology was employed to obtain a small RNA database and the miR166 family members of *R. glutinosa* were screened out. The precursor structures were analyzed by RNAfold. DNAMAN and MEGA were used for conservative and evolutionary analyses, respectively. TargetFinder software was used to predict the target genes of *R. glutinosa* miR166 family members. The expression of miR166 family members in response to abiotic stress was analyzed by real-time polymerase chain reaction(Real-time PCR). **Result:** Five miR166s were identified with precursors possessing complete stem-loop structures. As revealed by sequence alignment results, the precursors and matures were both highly conserved. Forty-eight target genes of miR166s were predicted, which were mainly annotated to the HD-

**[收稿日期]** 2022-08-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81603232);国家重点研发计划项目(2017YFC1702800)

**[第一作者]** 朱昀昊,博士,副教授,从事药用植物分子生物学研究,E-mail:guxinhan123@163.com

**[通信作者]** \*时博,硕士,副教授,从事中药质量分析研究,E-mail:xiaosehanfeng@126.com

ZIP III family transcription factors. The expression characteristics showed that the expression of miR160s was up-regulated after *R. glutinosa* was infected by endophytic fungi, which was different from the expression of the family members under abiotic stress. The expression level of rgl-miR166b-5p in the drought-flood treatment group and the high-low temperature treatment group was significantly down-regulated compared with that in the control group, and the expression pattern was opposite under the endophytic fungal infection. **Conclusion:** The results of this study preliminarily clarified the expression patterns of *R. glutinosa* in response to biotic and abiotic stresses and provided a theoretical basis for future breeding and improvement of *R. glutinosa*.

**[Keywords]** *Rehmannia glutinosa*; miR166; real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR); stress; expression

地黄为玄参科地黄属多年生草本植物,以其新鲜或干燥块根入药<sup>[1]</sup>,最早出现于《神农本草经》。因其具有强心利尿、抗炎解热、促进血液凝固和降低血糖等作用被广泛应用。目前市场上流通的地黄多数为人工种植的栽培品<sup>[2]</sup>,自然环境、病虫害及连作问题严重影响了地黄的产量和质量。地黄品种“沁怀”因光合速率<sup>[3]</sup>、综合抗逆性<sup>[4]</sup>较优;次生代谢成分梓醇、毛蕊花糖苷含量也较高<sup>[5-6]</sup>等原因,成为怀地黄主产区的主流品种之一。

微小核糖核酸(miRNA)作为一种内源性的单链分子,在植物中主要通过转录后调节靶基因的表达,参与了多种植物细胞的代谢过程<sup>[7]</sup>。其中miR166是陆生植物中最为古老的miRNA家族之一,在不同物种中具有极高的保守性<sup>[8-9]</sup>。大量研究表明,保守的miRNA参与调控最根本的生物过程<sup>[10]</sup>。近年来关于miR166家族成员的研究已经比较完善,大豆、玉米、拟南芥等多个物种都已经有关于miR166较为详尽的报道<sup>[11-13]</sup>。迄今为止,已经发现miR166能够调节植物的各种生长发育过程,其中包括种子发育、器官极性、根系发育等<sup>[14-16]</sup>。但是关于地黄中miR166的内容还存在空缺。

为了了解地黄中miR166家族成员及其可能的功能,笔者对地黄中的miR166家族成员进行保守性及进化性分析,预测地黄miR166家族成员前体序列的二级结构,对miR166家族成员的靶基因进行预测并对所有预测到的靶基因进行注释分析。最后通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)方法验证地黄miR166家族成员是否可能参与地黄组培苗对非生物胁迫的应答。为今后进一步研究地黄miR166的功能和相关生理作用机制提供了重要的理论依据。

## 1 材料

**1.1 植物材料及处理** 地黄组培苗由组培实验室提供,为玄参科地黄属地黄 *Rehmannia glutinosa*,经

河南中医药大学朱响昊副教授鉴定其品种为“沁怀”。“沁怀”品种优良,为地黄主产区的主流品种,故选为本文研究对象。挑选生长状态一致的地黄组培苗,转接至蛭石培养基中适应生长3 d,用于后续实验。每组处理12棵地黄组培苗,各处理包括干旱处理、涝处理、低温处理、高温处理、2种盐浓度处理及空白处理。取样样品在液氮中速冻后,保存在-80℃冰箱中。

**1.2 试剂** TRIzol总RNA提取试剂(康为世纪,批号60537),microRNA逆转录试剂盒(茎环法)(上海冠泰生物科技有限公司,批号A2029A001),PoweUp™ SYBR GREEN MASTER Mix(美国Applied Biosystems公司,批号A25742),无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇(天津市富宇精细化工有限公司,批号分别为20200718、20191225、20201019)。内生真菌GG22由实验室前期从地黄中分离得到,保存于4℃冰箱。

**1.3 仪器** Centrifuge 5810R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),721BR19129型高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司),Varioskan LUX型多功能微孔板阅读器(美国Thermo Scientific公司),QuantStudio 5型Real-time PCR仪(德国Applied Biosystems公司),MRC-1000D型植物培养箱(普朗特仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 内生真菌GG22侵染处理及miRNA文库建立** 选取生长状况一致的地黄组培苗,分为2组,一组接入已活化的内生真菌GG22菌片,菌片面积0.5 cm×0.5 cm,菌片距离地黄根部1 cm左右;另一组不接内生真菌,每组材料设置3个生物学重复。培养条件为,温度25℃,光照2 000 Lx,光照12 h·d<sup>-1</sup>,培养29 d后将组培苗取出,洗净,吸干水分,液氮冷冻后放入-80℃冰箱保存。组培苗材料经RNA提取,通过质量检测后,构建小RNA文库,

采用 HiSeq2500 平台进行测序, miRNA 文库构建和测序工作由联川生物技术有限公司完成。

**2.2 干旱、涝胁迫处理** 3个处理,分为空白组、干旱胁迫组、涝胁迫组,采用烘干衡重法测定水分含量。使用MS液体培养基(包含营养液和水)与蛭石拌匀,控制空白组含水量在50%左右(配好的培养基最终测定水分结果为52%);计算空白组中每升蛭石培养基中所包含的营养液的体积,保证每升蛭石中所含营养液体积与空白组相同,向蛭石中加入蒸馏水调节水分,然后控制干旱组水分在20%左右(配好的培养基最终测定水分结果为26%),控制涝组水分在80%左右(配好的培养基最终测定水分结果为79%)。光照培养箱培养条件,温度为26℃,湿度为19.9%,光照强度为4 000 Lx/12 h。取样时间为12 h。

**2.3 高温、低温胁迫处理** 3个处理,分为空白组、高温组及低温组。将适应生长3 d的地黄组培苗放入光照培养箱中培养,温度、湿度及光照强度均通过培养箱设定。低温组设置温度为0℃,高温组设置温度为40℃,空白组控制温度为26℃,3组处理除温度不同外,其余培养条件相同,湿度为45.6%,光照强度为4 000 Lx/12 h。在培养48 h后进行取样。

**2.4 盐胁迫处理** 3个处理,分为空白组及2种不同浓度的盐胁迫组。在适应生长3 d后的地黄组培苗中分别浇入不同浓度(100 mmol·L<sup>-1</sup>和200 mmol·L<sup>-1</sup>)的氯化钠溶液进行胁迫处理,空白组中浇入相同体积的蒸馏水。置于温度设定为26℃,湿度设定为45.6%,光照强度为4 000 Lx/12 h的光照培养箱中进行培养,于培养48 h时进行取样。

**2.5 地黄 miR166 家族成员前体序列和成熟序列的保守性分析** 从高通量测序获得的小RNA数据库中筛选得到地黄 miR166 家族的 miRNAs, 查找其成熟序列和前体序列。利用 DNAMAN 将地黄 miR166 家族成员的前体序列及成熟序列与拟南芥和水稻这2个物种中的 miR166 家族成员的成熟序列与前体序列进行多序列比对,分析其保守性。

**2.6 地黄 miR166 家族成员前体序列和成熟序列的进化性分析** 利用 MEGA 7.0 软件建立地黄、拟南芥和水稻的 miR166 家族成员的前体序列及成熟序列的系统进化树,分析其进化性。

**2.7 地黄 miR166 家族成员前体序列的二级结构预测** 利用 RNAfold 在线软件(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 预测地黄

miR166 家族成员的二级结构,分析地黄 miR166 家族成员的前体结构特征。

**2.8 地黄 miR166 家族成员靶基因的预测** 使用 psRNATarget (2017 Update) (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 软件对 miR166 家族成员进行靶基因预测(时间2020-05-27),并对其进行功能注释。

**2.9 地黄 miR166 家族成员的表达情况分析** 使用 TRIzol 试剂法提取各样品 RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 完整性。使用 miRNA 逆转录试剂盒(茎环法)进行反转录得到 cDNA。以 U6 为内参基因,采用相对定量法检测各样品中 miRNA 的表达量。荧光定量反应体系为 2× PowerUp™ SYBR™ GREEN MASTER Mix 10 μL, 上游引物和下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1 μL, cDNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL。利用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算各个样品中的 miRNA 的相对表达量。使用 GraphPad 软件检验各个样品中相对表达量的差异是否具有统计学意义。引物序列见表1。

表1 miR166s 引物序列

Table 1 miR166s primers

引物	序列(5'-3')	长度/bp
U6-q	上游 GATTTGTGCGTGTTCATCCTT	101
	下游 GGGGACATCCGATAAAATTGG	
a3p-q	上游 TCGGACCAGGCTTCA	145
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	
a5p-q	上游 GGGATGTTGGCTGGC	84
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	
b3p-q	上游 GGCGGAATGGAGGCTGTT	129
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	
b5p-q	上游 GCGGGATGTTGGCTG	82
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	
c-q	上游 TCTCGGACCAGGCTT	84
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	

### 3 结果与分析

**3.1 地黄 miR166 的鉴定** 从内生真菌 GG22 定殖前后的地黄小RNA数据库中筛选得到地黄中5个 miR166 家族成员,分别与 miRBase 数据库中 dpr-miR166a、 mtr-miR166e、 dpr-miR166b 和 sly-miR166c5p 具有较高的相似度,依次将其命名为 rgl-miR166a-5p、 rgl-miR166a-3p、 rgl-miR166c、 rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p,见表2。从地黄小RNA数据库中获得各个小RNA的前体序列和成熟序列,从表中可以看出 rgl-miR166a-5p 和

rgl-miR166a-3p 由同一个前体序列产生, rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p 也同样是由同一个前体序列产生。其中 rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166a-3p 均由前体序列 3' 端形成, rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166b-5p 则是由前体序列 5' 端形成。

表2 地黄 miR166 家族成员的鉴定

Table 2 Identification of *Rehmannia glutinosa* miR166s

miRNA 名称	成熟序列	匹配	错配数/个
rgl-miR166a-3p	UCGGACCAGGCUUCAUCCUC	dpr-miR166a	0
rgl-miR166a-5p	GGGAUGUUGGCUGGCUCGACG	mtr-miR166e-5p	2
rgl-miR166b-3p	UCGGACCAGGCUUCAUCCCC	dpr-miR166b	0
rgl-miR166b-5p	GGGAUGUUGGCUGGCUCGA	sly-miR166c-5p	3
rgl-miR166c	UCUCGGACCAGGCUUCAUCC	dpr-miR166a	4

### 3.2 地黄 miR166 前体序列的保守性和进化性分析

以 miR166 家族成员的前体序列和成熟序列为数据基础,使用软件 DNAMAN 对前体序列及成熟序列进行多序列比对分析,结果见图 1。使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,见图 2、图 3。从 miR166 成熟序列比对结果可以看出,地黄 miR166 家族成员在 3' 端形成的成熟序列和在 5' 端形成的成熟序列差别较大,且一般来说在 3' 端形成的成熟序列保守度更高,这也与其他文献中所得到的结果相一致,TCGACAGGCTTCATCC 为 3' 端成熟序列的保守序列部分。地黄 miR166 家族成员前体序列经多序列比对结果发现 miR166 家族具有 TCGACCAGGCTTCATCC 的一段保守序列,同 3' 端成熟序列的保守部分一致,而在其余区域保守度不高。从 miR166 家族的系统进化树结果也可以发现 miR166 家族成员成熟序列的 5' 端与 3' 端聚类结果是完全分开的,这也进一步说明了不仅是在地黄中,在其他的一些物种中也同样存在 5' 端序列与 3' 端序列差异比较大的特点。

3.3 地黄 miR166 家族的二级结构预测 利用在线工具 RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 预测得到 3 个 miR166 的二级结构。从预测的 miR166 二级结构可以看出,miR166 的前体都具有茎环结构,这也验证了 miR166 是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后产生。

miR166 的成熟体序列均位于 miR166 前体结构的长茎部位。将这 3 个 miR166 前体的二级结构对比发现,rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166a-3p 由同一个前体序列被剪切加工形成,rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p 由同一个 miRNA 前体序列被剪切加工形成。见图 4。

3.4 地黄 miR166 家族在内生真菌侵染中的靶基因预测 为了分析 miR166 家族在内生真菌侵染过程中的作用,使用在线工具 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 搜索前期构建的地黄内生真菌侵染的互作转录组数据库,对地黄中 5 个 miR166 家族成员的靶基因进行预测。结果显示,共预测到了 48 个靶基因,其中 rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166a-3p 靶基因均为 8 个,rgl-miR166c 有 7 个靶基因,rgl-miR166b-3p 的靶基因有 6 个,rgl-miR166b-5p 的靶基因最多共有 19 个。将 48 个靶基因进行 Nr 数据库注释发现,3 个基因属于同源异型结构域亮氨酸拉链蛋白(HD-ZIP)转录因子 III 亚家族。HD-ZIP III 是植物中特异的一类转录因子,能参与许多植物发育过程。有研究表明,miR166 家族主要的靶基因就是 HD-ZIP III,其通过差异表达调控靶基因对植物逆境胁迫的应答反应。其他靶基因还包括三磷酸腺苷酶,Dicer 酶、果胶酸裂合酶、葡萄糖-6-磷酸差向异构酶、晚期胚胎发生类似蛋白、苏氨酸蛋白激酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶等。

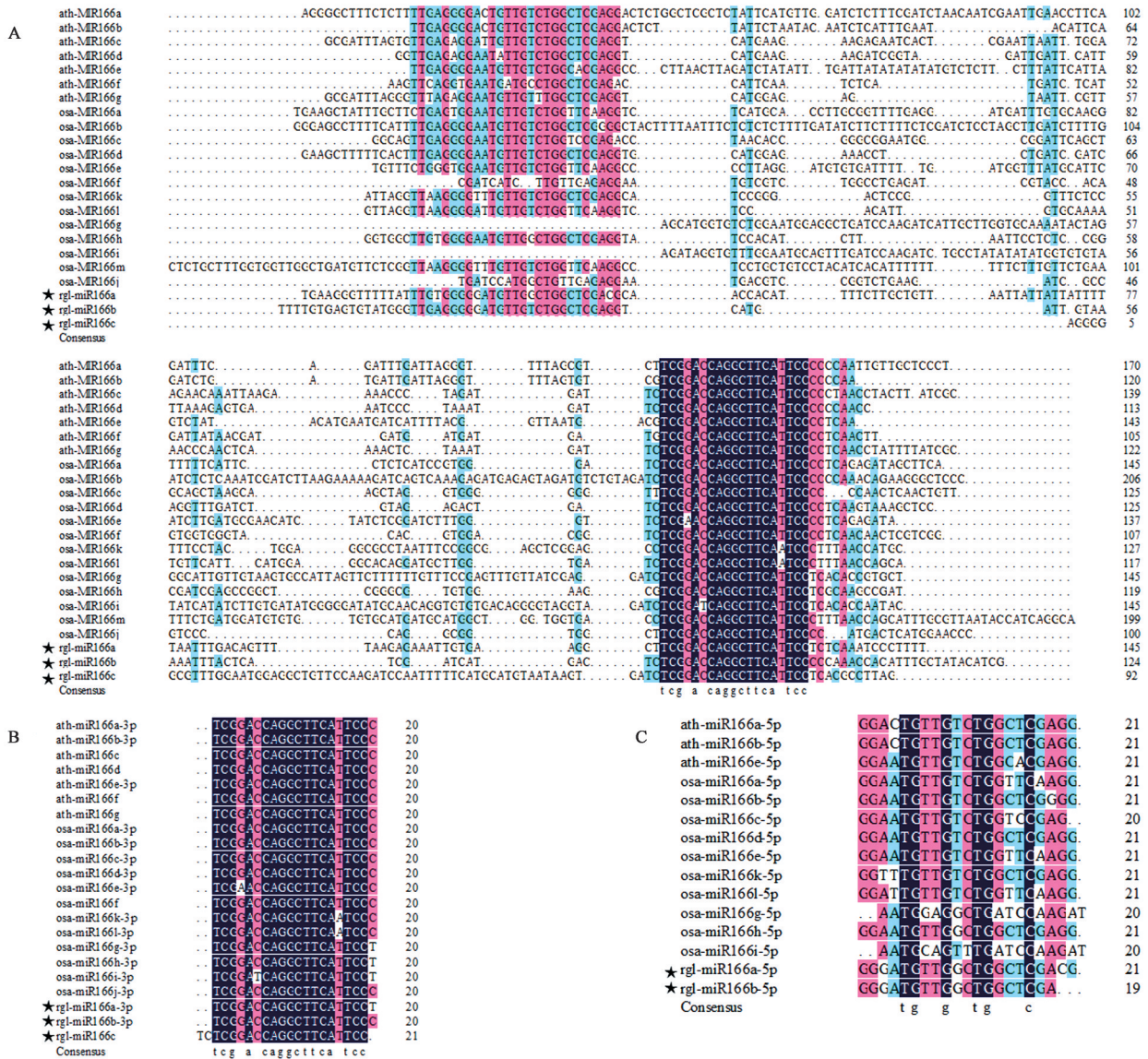
### 3.5 miR166 在地黄内生真菌侵染中的表达分析

从地黄 miR166 家族成员表达量的结果可以看出,在内生真菌侵染后,5 个 miR166 的表达量均呈上调表达,其中 rgl-miR166b-5p、rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166c 呈显著上调表达,表明在地黄响应内生真菌 GG22 定殖过程中,miR166 家族成员可能发挥一定的调控作用。见图 5。

### 3.6 地黄 miR166 响应非生物胁迫中的表达分析

3.6.1 干旱、涝胁迫 地黄 miR166 家族的 5 个家族成员在干旱处理组和涝处理组中的表达量变化情况见表 3。rgl-miR166a-3p、rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p 在干旱处理组和涝处理组中表达量均较空白组明显下降,但不同成员在干旱和涝中表达量也稍有不同。rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166c 的表达量变化情况相似,均表现为在干旱处理组中较空白组明显上调,而在涝处理组中显著下调表达。

3.6.2 高温、低温胁迫 地黄 miR166 家族成员在高温和低温的表达量变化情况见表 4。rgl-miR166b-5p 和 rgl-miR166c 在高温和低温处理后均



注:A.前体序列比对结果;B.5'端比对结果;C.3'端比对结果  
图1 miR166的多序列比对

Fig. 1 Result of multiple sequence alignment of miR166

较空白组明显上调表达,且 rgl-miR166c 在高温处理 48 h 后表达量相比空白组明显上调近 120 倍。rgl-miR166a-5p 高温处理组表达量相比空白组明显下调,低温处理组则表达量明显上调。rgl-miR166b-3p 在高温处理组较空白组明显上调表达,低温组表达量则显著下调。rgl-miR166a-3p 仅在低温处理组明显下调表达。

**3.6.3 盐胁迫** 对盐处理组中地黄 miR166 家族成员的表达量进行分析发现,rgl-miR166a-3p 和 rgl-miR166c 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理后表达量明显降低,在 200 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理后比空白组表达量显著上升。rgl-miR166a-5p 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理后表达量下调,而在 200 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理后表达量相

较空白组略有上调。rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p 在不同盐浓度处理后表达量与空白组比较均上调,rgl-miR166b-5p 在 200 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理组与空白组比较明显上调,rgl-miR166b-3p 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理组与空白组比较明显上调表达。见表 5。

4 讨论

大量研究表明,miR166 在植物生长发育及对逆境胁迫如干旱、盐害、重金属胁迫、病原菌侵害的响应等方面起着重要作用<sup>[17-19]</sup>。miR166 家族具有保守度高且家族成员多的特点,在拟南芥、玉米、水稻等植物中均有发现<sup>[20-22]</sup>。本实验以地黄为研究对象,共鉴定出 5 个 miR166 家族成员。利用所获得的 miR166 前体序列进行了二级结构的预测,验证了地

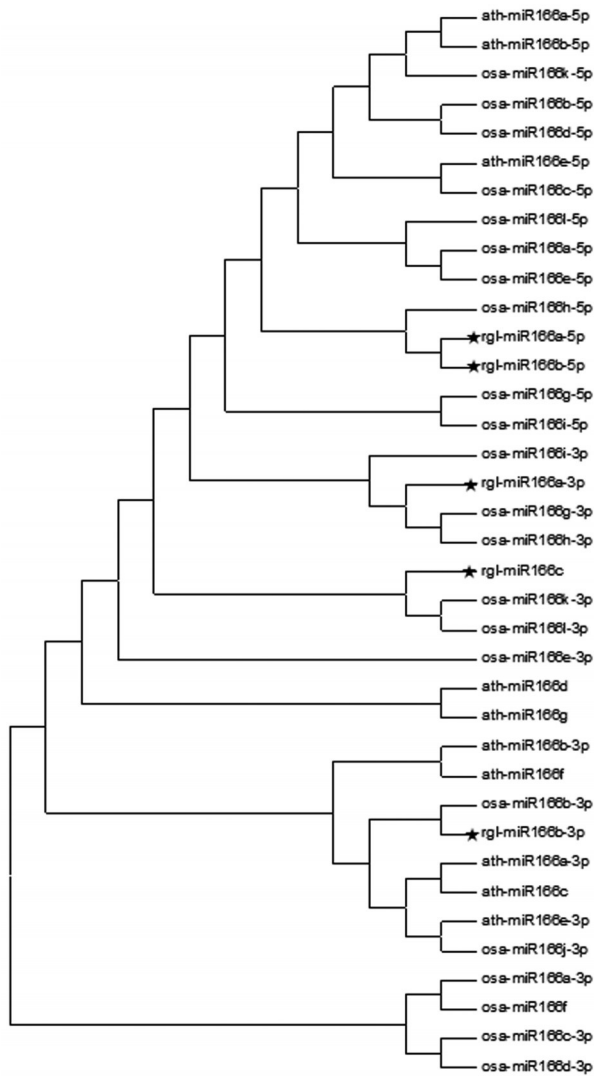


图2 miR166前体序列系统发育树  
Fig. 2 miR166 phylogenetic tree

黄miR166家族成员前体序列具有发卡结构这一特征,并证实了miR166由具有发卡结构的长为70~90个碱基大小的单链RNA前体经过Dicer酶加工后产生。同时也发现了同一个前体序列经Dicer酶切割可产生多个不同的miRNAs,这些miRNAs成熟序列的长度情况不同,序列中可能存在大量碱基互补区。同时实验将拟南芥、水稻的miR166家族成员与地黄中筛选到的5个miR166家族成员进行序列比对和系统进化性分析,再一次验证了miR166家族成员在5'端成熟序列上具有高度保守性,在进化过程中可能由于基因突变发生了个别碱基的改变。

本研究共预测到了48个地黄miR166的靶基因,这些靶基因各自发挥着不同的生理功能,这对进一步研究地黄miR166家族的生理功能和作用机制奠定了理论基础。综合来看,miR166家族成员能

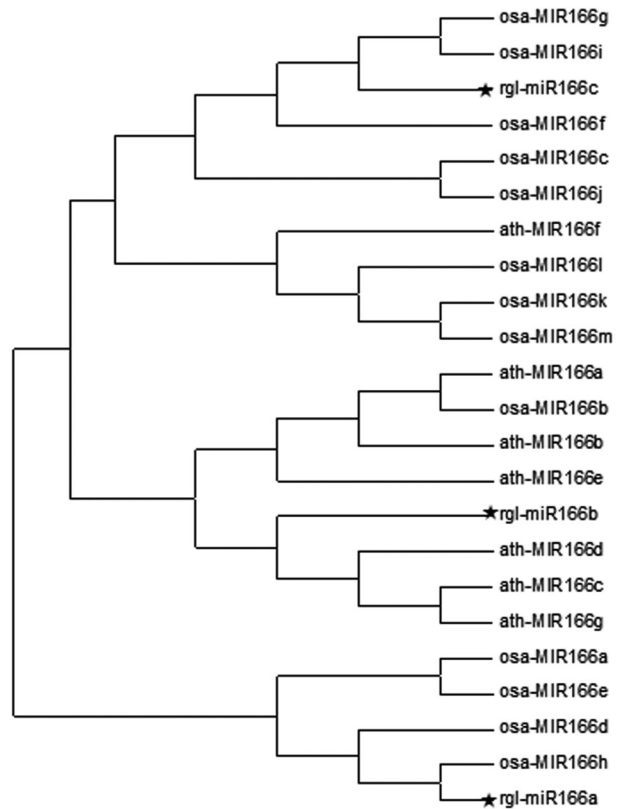


图3 miR166成熟序列系统发育树  
Fig. 3 miR166 phylogenetic tree

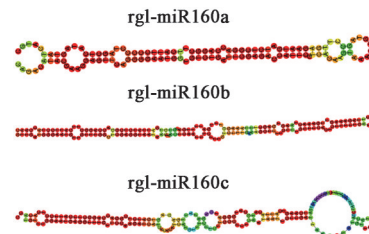
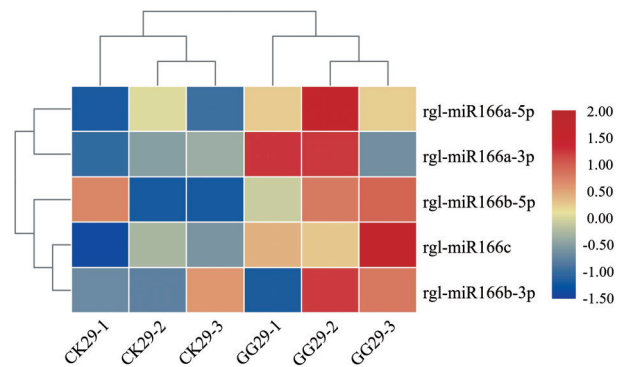


图4 miR166家族成员前体序列的二级结构  
Fig. 4 Secondary structure of precursor sequence of miR166 family member



注:CK29.空白组;GG29.接菌组

图5 地黄miR166家族成员内生真菌感染后的表达量  
Fig. 5 Expression levels of the *R. glutinosa* miR166

够通过控制调节多个靶基因,发挥生理功能,这些靶基因的功能主要是转录因子、氨基酸激酶、调节

表3 地黄 miR166 家族成员在旱、涝处理组中的表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Expression levels of *R. glutinosa* miR166 in drought and waterlogging treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	含水量/%	rgl-miR166a-3p	rgl-miR166a-5p	rgl-miR166b-3p	rgl-miR166b-5p	rgl-miR166c
空白组	50	1.03±0.05 <sup>a</sup>	1.00±0.09 <sup>b</sup>	1.00±0.10 <sup>a</sup>	1.00±0.07 <sup>a</sup>	1.01±0.05 <sup>b</sup>
干旱处理组	20	0.62±0.02 <sup>b</sup>	3.59±0.06 <sup>a</sup>	0.68±0.06 <sup>b</sup>	0.82±0.04 <sup>b</sup>	3.78±0.28 <sup>a</sup>
涝处理组	80	0.67±0.02 <sup>b</sup>	0.55±0.03 <sup>c</sup>	0.22±0.05 <sup>c</sup>	0.16±0.03 <sup>c</sup>	0.13±0.00 <sup>c</sup>

注:同列不同字母表示  $P < 0.05$  (表4、表5同)

表4 地黄 miR166 家族成员在高温、低温处理组中的表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Expression levels of *R. glutinosa* miR166s in high temperature and low temperature treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别/miRNA	温度/°C	rgl-miR166a-3p	rgl-miR166a-5p	rgl-miR166b-3p	rgl-miR166b-5p	rgl-miR166c
空白组	26	0.99±0.05 <sup>a</sup>	0.99±0.06 <sup>b</sup>	1.05±0.45 <sup>a</sup>	0.99±0.15 <sup>c</sup>	1.06±0.15 <sup>b</sup>
低温处理组	0	0.92±0.01 <sup>a</sup>	0.15±0.04 <sup>c</sup>	1.56±0.13 <sup>a</sup>	9.73±0.37 <sup>a</sup>	111.58±4.10 <sup>a</sup>
高温处理组	40	0.37±0.04 <sup>b</sup>	3.57±0.18 <sup>a</sup>	0.15±0.05 <sup>b</sup>	5.69±0.09 <sup>b</sup>	5.60±0.14 <sup>b</sup>

表5 地黄 miR166 家族成员在盐处理组中的表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Expression levels of *R. glutinosa* miR166s in salt treatment group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/mmol·L <sup>-1</sup>	rgl-miR166a-3p	rgl-miR166a-5p	rgl-miR166b-3p	rgl-miR166b-5p	rgl-miR166c
空白组		1.00±0.11 <sup>b</sup>	1.05±0.04 <sup>b</sup>	1.00±0.04 <sup>b</sup>	1.03±0.04 <sup>b</sup>	1.00±0.04 <sup>b</sup>
盐处理组	100	0.26±0.04 <sup>c</sup>	0.10±0.00 <sup>c</sup>	3.44±0.36 <sup>a</sup>	1.16±0.07 <sup>b</sup>	0.17±0.02 <sup>c</sup>
	200	2.50±0.05 <sup>a</sup>	1.15±0.00 <sup>a</sup>	1.37±0.00 <sup>b</sup>	28.09±1.00 <sup>a</sup>	3.17±0.03 <sup>a</sup>

蛋白及与多种代谢途径相关的酶。也就是说 miR166 通过作用于靶基因间接的影响某些作用因子或蛋白质,从而使机体内物质代谢发生变化,引起不同的生理变化,并且这种调节作用可能受外界因素的影响,激活或关闭,增强或减弱 miR166 的调节功能<sup>[23-24]</sup>。

接菌组中地黄 miR166 家族成员与空白组比较,发现 rgl-miR166b-3p、rgl-miR166a-5p 和 rgl-miR166c 呈显著上调表达,ZHANG 等<sup>[25]</sup>曾发现大力轮枝菌侵染下棉花 miR166s 出现上调表达。在非生物胁迫下,地黄 miR166 家族成员的情况并不具有统一性,在旱涝分别处理下,与空白组比较接菌组中 rgl-miR166a-3p、rgl-miR166b-3p 和 rgl-miR166b-5p 呈明显下调表达;在高温和低温处理下,rgl-miR166b-5p 和 rgl-miR166c 较空白组呈明显上调表达;与空白组比较,rgl-miR166a-3p 和 rgl-miR166c 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的盐处理后明显下调表达,而在 200 mmol·L<sup>-1</sup> 盐处理后显著上调表达。本试验研究发现在不同胁迫条件下,同一 miR166 的表达情况不同。前人已有研究表明不同物种中的 miRNA 的表达方式也不一样,如王静毅等<sup>[26]</sup>的研究发现 miR166a 在香蕉中会因为受到冷胁迫的影响而下调表达,而在韦春香等<sup>[27]</sup>的研究中发现干旱胁迫后黄芪叶中的 miR166l-3p 的表达量上调。miR166

家族成员响应胁迫的表达量变化情况并不是固定的,还与植物物种,分布位置及 miR166 个体有关系。本实验鉴定了地黄 miR166 家族成员,并验证了其序列特性和功能,为其他植物 miR166 家族成员的研究甚至对 miRNA 整体上作用机制、功能研究等提供了基础和理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:115.
- [2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药用植物栽培学[M]. 北京:农业出版社,1991.
- [3] 吴廷娟,田梦平,谢小龙. 不同地黄品种光合特性的比较研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2020,22(8):2899-2906.
- [4] 吴廷娟,田梦平,罗晓铮,等. 不同地黄种质资源的抗逆性研究[J]. 安徽农业科学,2021,49(5):175-177,224.
- [5] 谢彩侠,李雅静,张苗,等. 不同种质地黄块根菊花心与非菊花心部位有效成分特征分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(20):75-83.
- [6] 孟林,夏伟. 不同品种怀地黄质量比较[J]. 中医学报,2015,30(10):1464-1466.
- [7] CHEN X. Small RNAs and their roles in plant development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009, 25:

- 21-44.
- [ 8 ] FEYISSA B A, AMYOT L, NASROLLAHI V, et al. Involvement of the miR156/SPL module in flooding response in *Medicago sativa*[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3243.
- [ 9 ] LI X, XIE X, LI J, et al. Conservation and diversification of the miR166 family in soybean and potential roles of newly identified miR166s[J]. *BMC Plant Biol*, 2017, 17(1):32.
- [10] XIE Z, KHANNA K, RUAN S. Expression of microRNAs and its regulation in plants[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(8):790-797.
- [11] BARIK S, SARKARDAS S, SINGH A, et al. Phylogenetic analysis reveals conservation and diversification of micro RNA166 genes among diverse plant species[J]. *Genomics*, 2014, 103(1):114-121.
- [12] SINGH A, ROY S, SINGH S, et al. Phytohormonal crosstalk modulates the expression of miR166/165s, target Class III HD-ZIPs, and KANADI genes during root growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3408.
- [13] 武亮亮,张宁,朱熙,等. 马铃薯StmiR166b靶基因的鉴定及其表达分析[J]. *园艺学报*, 2019, 46(7):1333-1343.
- [14] TANG X, BIAN S, TANG M, et al. MicroRNA-mediated repression of the seed maturation program during vegetative development in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(11):e1003091.
- [15] MIYASHIMA S, HONDA M, HASHIMOTO K, et al. A comprehensive expression analysis of the *Arabidopsis* MICRORNA165/6 gene family during embryogenesis reveals a conserved role in meristem specification and a non-cell-autonomous function[J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(3):375-384.
- [16] IWAMOTO M, TAGIRI A. MicroRNA-targeted transcription factor gene RDD1 promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice[J]. *Plant J*, 2016, 85(4):466-477.
- [17] RAVICHANDRAN S, RAGUPATHY R, EDWARDS T, et al. MicroRNA-guided regulation of heat stress response in wheat [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1):488.
- [18] KITAZUMI A, KAWAHARA Y, ONDA T S, et al. Implications of miR166 and miR159 induction to the basal response mechanisms of an andigena potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) to salinity stress, predicted from network models in *Arabidopsis* [J]. *Genome*, 2015, 58(1):13-24.
- [19] VALIOLLAHI E, FARSI M, KAKHKI A M. Sly-miR166 and Sly-miR319 are components of the cold stress response in *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8(4):349-356.
- [20] ZHANG Q L, SU L Y, ZHANG S T, et al. Analyses of microRNA166 gene structure, expression, and function during the early stage of somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 147:205-214.
- [21] IWAMOTO M, TAGIRI A. MicroRNA-targeted transcription factor gene RDD1 promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice[J]. *Plant J*, 2016, 85(4):466-477.
- [22] ZHANG J, ZHANG H, SRIVASTAVA A K, et al. Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development[J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(3): 2082-2094.
- [23] 张秀妍,徐妙云,郑红艳,等. 盐胁迫下水稻体内miRNA表达谱分析[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(12):10-19.
- [24] 刘凉琴,宋爱萍,张永侠,等. 马蔺根系响应Cd胁迫的miRNA高通量测序分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2016, 25(3):1-11.
- [25] ZHANG T, ZHAO Y L, ZHAO J H, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen[J]. *Nat Plants*, 2016, 2(10):16153.
- [26] 王静毅,刘菊华,金志强,等. 香蕉冷胁迫相关MicroRNA差异表达分析[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(5):49-57.
- [27] 韦春香,肖自华,黄曦,等. 黄芪miRNA的预测及其干旱表达模式分析[J]. *中草药*, 2017, 48(1): 155-164.

[责任编辑 顾雪竹]