

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220211

# PEG 和 NaCl 胁迫下毛竹萌发种子的 MicroRNAs 表达谱分析

王晓静<sup>1,4</sup>, 王 涛<sup>2</sup>, 杨 凯<sup>3</sup>, 李潞滨<sup>1\*</sup>

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

2. 北京市花卉园艺工程技术研究中心/城乡生态环境北京实验室, 北京植物园, 北京 100093;

3. 北京农学院植物科学与技术学院, 北京 100096; 4. 运城学院生命科学系, 山西 运城 044011)

**摘要:** [目的] 鉴定和分析不同干旱和盐胁迫下毛竹种子在露白时期的 microRNAs (miRNAs) 及其表达模式。

[方法] 分别使用聚乙二醇 (PEG6000) 和氯化钠 (NaCl) 模拟干旱和盐胁迫, 构建 H<sub>2</sub>O、10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理下毛竹露白时期种子的 small RNA 文库, 通过高通量测序和生物信息学分析揭示样本中的 miRNA 及其表达谱。[结果] 通过 small RNA 测序共鉴定了 246 条已知 miRNAs 的成熟体序列, 并预测得到 262 条 novel miRNAs 的成熟体序列; 在毛竹种皮破裂阶段的种子中, 丰度最高的已知 miRNA 为 miR166, 其次是 miR159、miR6478、miR319 等; 根据 miRNA 靶基因预测结果, 靶基因数量最多的已知 miRNA 属于 MIR396 家族, PH02Gene13935 (GAMYB) 被预测受到 MIR159、MIR319、MIR396 家族共 28 个 miRNAs 的调控; 在 6 个比较组中共鉴定了 181 个差异表达 miRNA, 与对照组相比, 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下表达水平最高且显著差异表达的已知 miRNA 分别为 phe-miR171e-5p、phe-miR3630-3p、phe-miR171e-5p 和 phe-miR159a.1; 差异表达 miRNA 靶基因能够显著富集在不同的 GO 和 KEGG 途径中; 对 10 个差异表达 miRNAs 进行 qRT-PCR 验证, 荧光定量结果的整体趋势和测序数据一致。[结论] 毛竹种皮破裂阶段种子中积累了大量的 miR159、miR6478、miR319 等已知 miRNA, 且在对照和胁迫处理组中均具有高表达水平, 可能在毛竹种子萌发中具有保守调控作用; 与对照组相比, phe-miR171e-5p、phe-miR3630-3p、phe-miR171e-5p 和 phe-miR159a.1 在 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下分别显著差异表达, 能够在毛竹种子露白阶段响应 PEG 或 NaCl 胁迫。

**关键词:** 毛竹; 种子萌发; PEG; NaCl; miRNA

中图分类号: S795

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)02-0107-12

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 属于禾本科 (Gramineae) 竹亚科 (Bambusoideae) 刚竹属 (*Phyllostachys* Sieb. Et Zucc.), 是一种多年生木本散生竹, 广泛分布在 46° N 以南地区, 是我国种植面积最广的竹种之

一, 具有重要的经济、生态和文化价值<sup>[1-2]</sup>。毛竹开花后产生典型颖果类果实, 薄而干的膜质果皮与种皮紧密贴合, 在种子生物学和苗木培育上毛竹颖果通常被称为种子<sup>[3]</sup>。毛竹种子萌发是实生苗造林的基础, 通过毛竹种子萌发进行实生苗造林能降低

收稿日期: 2022-04-27 修回日期: 2022-07-07

基金项目: 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2017ZY005); 优秀博士来晋科研专项 (QZX2023001)

作者简介: 王晓静, 博士研究生。主要研究方向: 竹类植物资源与应用。Email: wangxjwork@163.com

\* 通讯作者: 李潞滨, 博士, 研究员。主要研究方向: 植物功能基因组学。Email: lilubin@126.com

运输成本, 便于移栽, 有利于提高造林整齐度、成活率和遗传多样性, 延长竹林高产时间, 且实生苗竹林萌芽多、竹鞭生长较快、竹材利用率更高<sup>[4-5]</sup>, 因此, 开展毛竹种子萌发研究对于竹类资源的培育和应用等具有重要意义。

随着气候变化的加剧, 干旱和由土壤初级或次级盐碱化造成的盐胁迫已经成为全球性问题, 并对种子萌发、植物生长等造成严重影响<sup>[6-7]</sup>。干旱和盐胁迫抑制了毛竹种子的萌发, 进而影响了毛竹实生苗的生长, 限制了通过毛竹种子萌发进行实生苗培育和应用<sup>[8]</sup>。目前, 研究者逐步开展了干旱或盐胁迫对毛竹种子萌发率、种子活力、种子寿命和萌发后幼苗生长等生理方面的研究<sup>[9-12]</sup>, 但相关的分子调控机制鲜有报道。

MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为 21~24 nt 的小分子非编码 RNA, 能够通过互补配对抑制或降解靶基因进行转录后调控<sup>[13]</sup>。miRNA 广泛参与了植物的生长发育<sup>[13-15]</sup>, 在种子萌发<sup>[16-18]</sup> 和非生物胁迫响应<sup>[19]</sup> 中具有重要的调控作用。在竹类植物中, 研究者已经在组学水平开展了关于毛竹叶片<sup>[20]</sup>、花发育<sup>[21]</sup>、雄蕊发育<sup>[22]</sup>、茎秆快速生长<sup>[23]</sup> 和竹笋发育<sup>[24]</sup> 等的 miRNA 研究, 但毛竹种子中 miRNA 的表达及其在干旱和盐胁迫下萌发时的调控仍是未知的, 因此, 本研究通过 small RNA 测序对毛竹种子露白阶段的 miRNA 进行系统分析, 并探究其在不同 PEG 或 NaCl 胁迫下萌发时的表达模式, 挖掘毛竹种子萌发阶段调控干旱或盐胁迫抗性潜在的关键 miRNA, 以期为后续的研究提供基础和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验所用毛竹种子于 2020 年 9 月收集自广西壮族自治区桂林市灵川县, 剥除外稃后挑选大小均一、颗粒饱满、色泽明亮的完整种子备用 (图 1a)。种子的千粒质量为  $21.85 \text{ g} \pm 0.04 \text{ g}$ , 含水量为  $12.05\% \pm 0.35\%$ 。种子表面消毒后在培养皿中使用纸床法进行萌发<sup>[11]</sup>。聚乙二醇 (PEG6000) 是一种亲水性大分子物质, 是模拟植物干旱胁迫的常用试剂之一, 本研究使用 PEG6000 模拟干旱胁迫环境, 同时使用氯化钠 (NaCl) 模拟盐胁迫。使用完全随机实验设计, 将种子分为 5 组 (A~E): A 组为对照组, B 组、C 组模拟干旱胁迫, D 组、E 组模拟盐胁迫。参考前期预实验的结果, 分别在

培养皿中加入  $\text{H}_2\text{O}$  (A)、10% PEG (B)、15% PEG (C)、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl (D) 和  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl (E), 每组萌发 200 粒种子, 并重复 3 次。每天观察并记录种子萌发状态, 在第 4 天选择生长状态一致且均到达种皮破裂阶段的种子 (图 1b)。对于每个处理, 在 3 个重复中各取 5 粒种子并将 15 粒种子混合取样后用于建库。取样后使用液氮速冻并置于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。



图 1 毛竹干种子 (a) 及种皮破裂阶段取样的萌发种子 (b)

Fig. 1 Dry seeds (a) and sampled seeds germinated at seed coat rupture stage (b) of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)

### 1.2 建库、测序与数据过滤

使用植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒 (DP441, TIANGEN) 提取样品总 RNA。在建库时首先根据 small RNA 的结构特点将总 RNA 中 small RNA 加接头并进行纯化, 随后进行反转录、PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 切胶回收目的条带即得到 small RNA 的 cDNA 文库。文库有效浓度合格后进行测序, 使用 Illumina 高通量测序平台 NovaSeq 6000 进行单端测序, 测序长度为 50 bp。对获得的原始数据首先进行过滤, 去除接头序列、低质量序列、含 N 比例 >10% 的序列、5' 接头污染的序列、没有 3' 接头序列和插入片段的序列及含连续的 T/G/C 的序列; 以及长度异常的序列。

### 1.3 miRNA 鉴定

首先将过滤后的数据比对到 miRbase 数据库 (V22) 鉴定已知 miRNA<sup>[25]</sup>; 将未比对至 miRBase 的数据比对至 Rfam 数据库中的 ncRNA 序列 (rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA) 和参考基因组重复序列<sup>[26]</sup>; 随后对于上述均未比对中的 clean reads, 使用 mirEvo 和 miRdeep2 进行新 miRNA 预测<sup>[27-28]</sup>。对于已知和新的 miRNA 序列, 将其前体序列比对至 miRBase 数据库进行 microRNA 家族的鉴定<sup>[25]</sup>。

### 1.4 表达水平分析

为了探究毛竹种子萌发露白阶段 miRNA 的

表达,首先统计各样本中已知和新 miRNA 的 readscount,进行 TPM (Transcripts per million) 归一化转化 ( $TPM = \text{readscount} \times 10^7 / \text{library size}$ )。随后使用 edgeR 软件进行差异表达分析,以鉴定露白阶段毛竹种子响应干旱或盐胁迫的 miRNA<sup>[29]</sup>,差异表达 miRNA 筛选条件为  $|\log_2 \text{foldchange}| \geq 1$  且  $p < 0.05$ 。

### 1.5 靶基因预测及功能富集分析

为了探究毛竹萌发种子中 miRNA 的潜在功能,对本研究中已知和新 miRNA 的靶基因进行预测,并进行靶基因的 KEGG 和 GO 功能富集;同时通过对差异表达 miRNA 靶基因的功能富集,进一步分析毛竹萌发种子中 miRNA 响应干旱或盐胁迫的潜在通路或途径。使用软件 TargetFinder 和 psRNAtarget 进行 miRNA 靶基因的预测,并对预

测结果取交集<sup>[30-31]</sup>。使用 OmicShare 在线平台 (<https://www.omicshare.com/tools>) 进行靶基因 KEGG 和 GO 功能富集,富集显著性阈值为  $p < 0.05$ <sup>[32-33]</sup>。

### 1.6 差异表达 miRNA 验证

总 RNA 提取方法同 1.2,反转录使用 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (KR211, TIANGEN),荧光定量检测使用增强型荧光定量试剂盒 (FP411, TIANGEN)。荧光定量正向引物见表 1,反向引物使用试剂盒通用引物,内参引物为 U6<sup>[34]</sup>。荧光定量检测仪器为 qTOWER3.0 (Analytik jena),每个基因进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算相对表达水平<sup>[35]</sup>。

表 1 差异表达 miRNA 荧光定量验证引物序列

Table 1 Primers used for quantitative real time PCR of Differential expressed miRNA

miRNA编号 miRNA ID	引物方向 Primer direction	引物序列 Sequence (5'-3')
phe-miR3630-3p	F	UGUGGGAUUCUCUCUGAUGCUU
phe-miR159a.1	F	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG
phe-miR168a-5p	F	UCGCUUGGUGCAGAUCGGGAC
phe-miR171e-5p	F	UGUUGGCUCGGCUCACUCAGA
phe-miR396e-5p	F	UCCACAGGCUUUCUUGAACUG
phe-miR894	F	CGUUUCACGUCGGGUUCACC
phe-miR6478	F	CCGACCUUAGCUCAGUUGGUG
novel_14	F	CUGAGAGGUAGAGAACGGGAUG
novel_311	F	UCGUGUGCUGAACUUUAUUGA
novel_5	F	AUCUCAGCUGUUGAUUCCAUGAUC
u6	F	GGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAG

## 2 结果与分析

### 2.1 small RNA 测序结果

small RNA 测序结果表明:每个文库产出数据约 0.9~1.8 GB,过滤后每个样本中分别有 12 984 751 条 (A, H<sub>2</sub>O)、14 982 423 条 (B, 10% PEG)、13 401 719 条 (C, 15% PEG)、13 995 450 条 (D, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) 和 11 452 796 条 (E, 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) Clean Reads (表 2)。Clean Reads 的 Q20 值约为 98%, Q30 值均  $\geq 93\%$ ,与毛竹参考基因组的比对率  $\geq 88.42\%$ ,表明测序数据质量较好。具体数据产出及比对情况见表 2。

### 2.2 miRNA 鉴定与 miRNA 家族分析

对 small RNA 数据库中 miRNA 进行比对和预测,结果显示:每个样品中有 0.08%~0.11% 的序列被注释为已知 miRNA, 0.10%~0.11% 的序列被预测为 novel miRNA。对 miRNA 长度进行统计发现本研究成熟 miRNA 长度主要分布在 21 nt 和 24 nt (图 2)。本研究共鉴定 miRNA 成熟体序列 508 条,前体序列 845 条,其中,已知 miRNA 成熟体序列数量为 246,前体序列数量为 574,鉴定出 novel miRNA 成熟体数量共有 262 条,前体序列数量为 271。

表 2 small RNA 数据产出信息

Table 2 Statistics of sequence data in small RNA libraries

样品名称 Sample	原始读序 Raw Reads	Q20值 Q20/%	Q30值 Q30/%	GC含量 GC Content/%	过滤后读序数 Clean Reads	比对sRNA数量 Mapped sRNA
A	29 379 983	98	94	54	12 984 751	11 504 336 (88.60%)
B	37 101 403	98	93	54	14 982 423	13 326 206 (88.95%)
C	32 426 286	98	94	54	13 401 719	11 915 649 (88.91%)
D	33 041 222	98	94	54	13 995 450	12 374 157 (88.42%)
E	19 605 421	98	93	53	11 452 796	10 198 110 (89.04%)

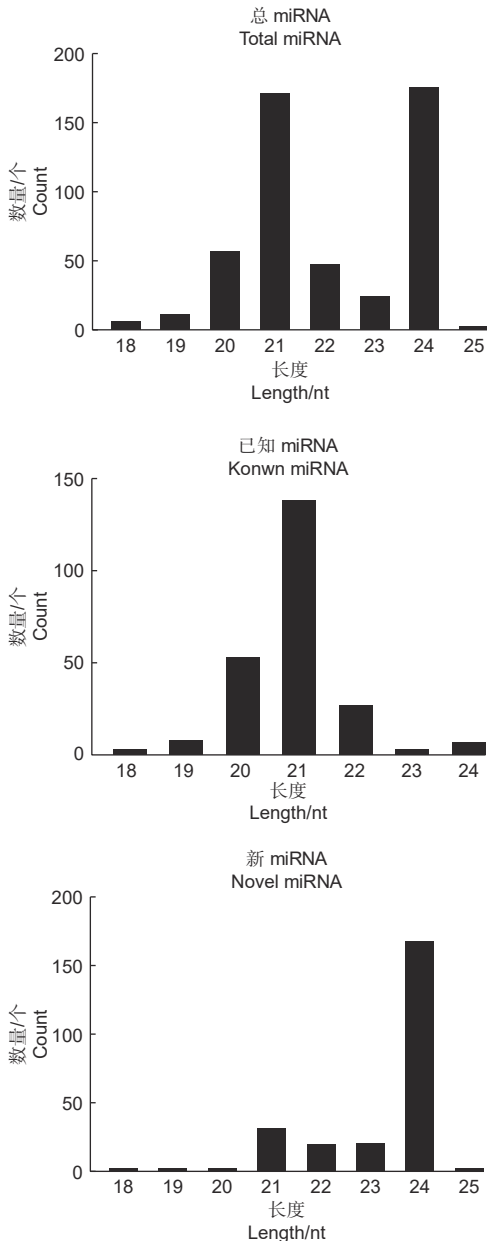


图 2 已知和新预测 miRNA 长度统计

Fig. 2 Length distribution of known and novel miRNA

对 miRNA 前体序列进行家族分析, 共鉴定到包含 514 条前体序列的 45 个家族, 包括 MIR159、

MIR166、MIR156、MIR408、MIR399、MIR530 等, 其中, 有 10 条新 miRNA 前体序列也被鉴定属于已知家族, 如 novel\_57 属于 MIR408, novel\_14 和 novel\_66 属于 MIR169\_2。统计每个家族包含的前体成员数目表明, 本研究毛竹萌发种子中最大的 miRNA 家族为 MIR159, 包含 54 个成员, 其次为 MIR166 (48)、MIR156 (46)、MIR167\_1 (37)、MIR396 (32) 等 (详细数据未列出)。

### 2.3 miRNA 表达水平分析

毛竹萌发种子中表达量前 5 的已知 miRNA 分别为 phe-miR166a-3p、phe-miR159a.1、phe-miR319a-3p.2-3p、phe-miR6478、phe-miR156a-5p, 表达量前 5 的新 miRNA 分别为 novel\_1、novel\_199、novel\_311、novel\_241、novel\_2, 其中, novel\_1 在 5 个样本所有 miRNA 中表达量均为最高。表达量前 10 的新 miRNA 折叠最小自由能值为  $-187.0 \sim -13.8 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (表 3、4)。

对每个样本中表达水平前 10 的已知 miRNA 和新 miRNA 的进行 TPM 值统计, 结果表明: 排名前 10 的已知 miRNA 在每个样本总 miRNA 中的读序丰度 (total miRNA reads) 占 45%~51.8%, 排名前 10 的新 miRNA 在每个样本总 miRNA 中的读序丰度中占 23.1%~29.5%。PEG 和 NaCl 胁迫下这些 miRNA 在毛竹露白阶段种子表达水平均较高, 推测其在毛竹种子萌发的调控中可能具有保守的重要作用。

### 2.4 差异表达分析

通过差异表达分析, 本研究共鉴定 181 个差异 miRNA, 其中, 有 84 个上调表达, 97 个下调表达 (图 3 a)。与对照组 (A) 相比, 10% PEG (B)、15% PEG (C)、50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl (D)、100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl (E) 4 种胁迫下分别有 20、26、41 和 24 个差异表达 miRNA (DEmiRNA), 此外在 B-C 和 D-E 比较组分别

表 3 Small RNA 文库中预测出前 10 位的保守 miRNA 及其序列表达量及同源性

Table 3 Sequences abundance and homologues of top ten predicted conserved miRNA in five libraries

同源序列名称 Name	序列 Sequence	表达量 (TPM Counts)				
		A	B	C	D	E
phe-miR166a-3p	UCGGACCAGGCUUCAUUC CCC	74 864	57 593	64 907	73 677	66 116
phe-miR159a.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	54 736	42 178	41 405	45 018	31 525
phr-miR319a-3p.2-3p	UUGGACUGAAGGGUGCUCCC	27 992	25 959	28 454	25 962	27 126
phe-miR6478	CCGACCUAGCUCAGUUGGUG	25 651	48 135	24 454	21 842	28 992
phe-miR156a-5p	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	17 694	16 099	15 274	23 739	28 492
phe-miR167d-5p	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	17 288	28 696	19 426	18 345	16 262
phe-miR396e-5p	CGUUUCACGUCGGGUUCC	12 919	15 012	12 456	10 017	18 662
phe-miR894	UCCACAGGCUUUCUUGAACUG	11 796	17 105	14 627	10 106	5 332
phe-miR166k-3p	UCGGACCAGGCUUCAUCCCU	8 925	6 641	5 866	11 706	14 463
phe-miR319a	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU	8 707	6 761	6 437	7 528	7 898

表 4 Small RNA 文库中预测出前 10 位新 miRNA 序列及其表达量

Table 4 Sequences abundance and homologues of top ten predicted novel miRNA in five libraries

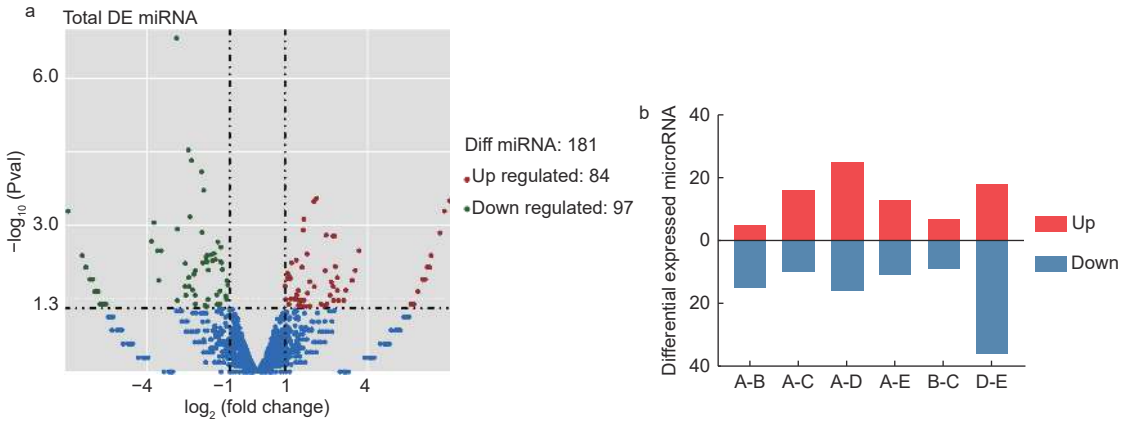
名称 Name	序列 Sequence	表达量 (TPM counts)					最小折叠自由能 Hairpin mfe/(KJ·mol <sup>-1</sup> )
		A	B	C	D	E	
novel_1	CUUCACUCUUCAGACUUUGAG	174 786	172 858	173 542	135 291	189 416	-46.6
novel_199	CGAUUAGUCGGCAAGUCGGGCGACU	17 413	23 705	16 760	12 951	15 796	-44.7
novel_311	UCGUGUGCUGAACUUUAUUGA	15 135	31 513	36 072	22 702	16 496	-13.4
novel_241	UUACCGGUCUUUAACUUUUUAU	14 792	17 990	26 054	17 486	11 764	-175.9
novel_2	CCGGUCUAUAGAUUUUCAAGUG	8 332	10 464	14 170	13 544	9 664	-115.7
novel_3	UCUCGGAUCAGGCUUCGUUCC	7 084	5 594	5 180	5 424	10 664	-39.4
novel_287	AUCGCGAUCUUGACAACCUUGACU	5 586	6 600	8 761	9 543	7 165	-27.5
novel_5	AUCUCAGCUGUUGAUUCAUGAUC	4 993	3 381	4 723	6 698	2 299	-32.8
novel_9	CCUUCGAUCGUAUGAUGUGUCACG	4 494	4 306	4 457	4 742	2 799	-98.6
novel_87	UGUAGGAUCUCUGAUGACGGU	3 776	5 031	5 371	3 082	6 765	-187.0

有 16 和 54 个 DE miRNA (图 3 b)。

依据 miRNA 的差异表达情况和表达水平, 对本研究具有高丰度且显著差异表达的 miRNA 进行聚焦。与对照组相比, 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 中表达水平最高的 DE miRNA 分别为 novel\_14、novel\_311、novel\_14、phe-miR159a.1, 表达水平最高的已知 DE miRNA 分别为 phe-miR171e-5p、phe-miR3630-3p、phe-miR171e-5p 和 phe-miR159a.1, 这些 miRNA 在毛竹种子萌发露白阶段中大量积累, 同时在 PEG 或 NaCl 胁迫下差异表达, 可能参与了种子萌发露白阶段 miRNA 对于干旱或盐胁迫的调控。

## 2.5 miRNA 靶基因预测

通过 Targetfinder 预测, 共获得 505 个 miRNA 的 31 729 个靶基因, psRNAtarget 预测结果中 501 个 miRNA 可以靶向 22 215 个基因。对 2 个软件的预测结果取交集后共有 17 666 对 miRNA-靶基因关系, 包含 489 个 miRNA 和 8 812 个靶基因。预测的 miRNA-靶基因关系中, novel\_153 的靶基因数目最多, 有 188 个靶基因, 其次是 phe-miR396b (167 个)、phe-miR396e-5p (161 个)、phe-miR396h (141 个)、phe-miR164b (138 个)。对同一 miRNA 家族成员的靶基因数目进行统计, 靶基因数目前十的家族中 MIR396 家族靶基因数目最多。此外, 根据预测结果 8 812 个靶基因中每个



注：(a) 所有比较组差异表达 miRNA 火山图；(b) 不同比较组差异表达 miRNA 统计

Notes: (a) Volcano plot of DE miRNA in all comparison groups. (b) Statistic of DE miRNAs in different comparison groups

图 3 差异表达 miRNA 统计  
Fig. 3 Statistic of DE miRNAs

基因能够受到 1~28 个 miRNA 靶向, 表明在毛竹种子萌发过程存在复杂的 miRNA 调控网络。具有 miRNA-gene 关系最多的基因中, 排名前 20 的基因有 7 个属于 *GAMYB* (*Gibberellin MYB*) 家族, 12 个属于 *SPL* (*Squamosa promoter-binding-like*) 家族, 推测 *GAMYB* 和 *SPL* 基因家族在毛竹萌发种子 miRNA 调控网络中可能具有重要意义。

## 2.6 差异表达 miRNA 靶基因功能富集分析

根据靶基因预测结果, A-B、A-C、A-D、A-E、B-C、D-E 6 个比较组差异表达 miRNA 分别有 609、548、1 011、812、460 和 1 866 个靶基因。GO 富集结果显示: 6 个组合差异表达 miRNA 的靶基因分别显著富集在 520 (A-B)、516 (A-C)、620 (A-D)、446 (A-E)、483 (B-C)、610 (D-E) 个条目中, 总计 1 989 个涉及细胞成分、生物学过程和分子功能的条目, 推测 miRNA 可以通过这些靶基因广泛地参与不同的生物学过程或分子功能等调控。表 5 为不同比较组 GO 富集前 10 的生物学过程条目, 与对照组相比, 10% PEG (B)、15% PEG (C)、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl (D)、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl (E) 胁迫下 DE miRNA 靶基因富集最显著的生物学过程分别为跨膜转运 (GO:0055085)、DNA 复制正向调控 (GO:0045740)、发育过程 (GO:0032502)、海藻糖生物合成 (GO:0005992), 推测这些生物学过程对于 miRNA 调控 PEG 和 NaCl 胁迫下的种子萌发具有重要作用。

KEGG 富集结果 (表 6) 表明: 苯丙烷生物合成途径在 A-B、A-C、A-E 3 个组合中被显著富

集, 推测苯丙烷生物合成途径对于毛竹种子萌发露白阶段 miRNA 响应 PEG 和 NaCl 胁迫可能具有重要意义, 但毛竹种子萌发过程 miRNA 与苯丙烷合成途径关键基因的靶向关系及其是否共同调控干旱或盐胁迫下的种子萌发需要进一步的研究和验证。此外, 果糖和甘露糖代谢、玉米素生物合成途径仅在盐胁迫下 (A-D 和 A-E) 显著富集, 油菜素内酯生物合成和脂肪酸降解途径仅在 A-B 中显著富集, 表明在毛竹种子露白阶段 miRNA 响应 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫的调控通路也存在差异。

## 2.7 差异表达 miRNA qPCR 验证

随机选取 10 个在不同样本间存在差异表达的 miRNA 进行 qPCR 验证, miRNA 的表达量在不同处理组之间被上调或下调, 如 phe-miR6478 在 10% PEG 胁迫下比对照组上调 1.45 倍, phe-miR3630-3p 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下上调 1.33 倍, phe-miR171e-5p 在 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下分别下调 0.23、0.50、0.56 和 0.61 倍 (图 4)。miRNA 荧光定量结果和 small RNA 测序数据在表达趋势上整体一致, 表明测序数据的可靠性。

## 3 讨论

在本研究中, miR166、miR159、miR319、miR156、miR396、miR167、miR168、miR894、miR160 等在对照组和不同浓度的 PEG 和 NaCl 胁迫条件下均具有较高表达水平, 推测这些 miRNA 可

表 5 不同比较组差异表达 miRNA 靶基因 GO 显著富集性前 10 条目

Table 5 Top 10 significantly enriched GO terms for DE miRNA target genes in different comparison groups

比较组 Comparison Groups	GO编号 GO ID	GO条目 GO Term	基因数量 Gene Number	P值 P-Value
A-B	GO:0055085	跨膜转运 Transmembrane transport	233	2.49E-11
A-B	GO:0098656	阴离子跨膜转运 Anion transmembrane transport	49	1.12E-07
A-B	GO:0006820	阴离子转运 Anion transport	75	1.48E-07
A-B	GO:1903825	有机酸跨膜转运 Organic acid transmembrane transport	41	1.83E-07
A-B	GO:1905039	羧酸跨膜转运 Carboxylic acid transmembrane transport	41	1.83E-07
A-B	GO:0003333	氨基酸跨膜转运 Amino acid transmembrane transport	38	2.49E-07
A-B	GO:0006865	氨基酸转运 Amino acid transport	38	6.65E-07
A-B	GO:0006811	离子转运 Ion transport	169	6.90E-07
A-B	GO:0006885	pH调节 Regulation of pH	25	1.14E-06
A-B	GO:0055067	单价无机阳离子稳态 Monovalent inorganic cation homeostasis	26	1.21E-06
A-C	GO:0045740	DNA复制的正调控 Positive regulation of DNA replication	7	4.04E-07
A-C	GO:0034644	细胞对紫外线的反应 Cellular response to UV	6	1.23E-06
A-C	GO:0019985	跨损伤合成 Translesion synthesis	7	1.40E-06
A-C	GO:0000731	参与DNA修复的DNA合成 DNA synthesis involved in DNA repair	8	1.57E-06
A-C	GO:0051052	DNA代谢过程的调节 Regulation of DNA metabolic process	14	1.99E-06
A-C	GO:0072593	活性氧代谢过程 Reactive oxygen species metabolic process	36	2.97E-06
A-C	GO:0055074	钙离子稳态 Calcium ion homeostasis	5	3.06E-06
A-C	GO:0071482	细胞对光刺激的反应 Cellular response to light stimulus	13	3.24E-06
A-C	GO:0006979	对氧化应激的反应 Response to oxidative stress	41	5.55E-06
A-C	GO:0051054	DNA代谢的正调控 Positive regulation of DNA metabolic process	7	6.17E-06
A-D	GO:0032502	发育过程 Developmental process	288	9.35E-09
A-D	GO:0080022	初生根发育 Primary root development	11	6.87E-08
A-D	GO:0044767	单一有机体发育过程 Single-organism developmental process	266	1.59E-06
A-D	GO:0016567	蛋白质泛素化 Protein ubiquitination	104	2.24E-06
A-D	GO:0009657	质体组织 Plastid organization	46	2.80E-06
A-D	GO:0070647	通过小蛋白结合或去除来修饰蛋白质 Protein modification by small protein conjugation or removal	128	3.51E-06
A-D	GO:0046271	苯丙烷代谢生物过程 Phenylpropanoid catabolic process	21	6.65E-06
A-D	GO:0046274	木质素分解代谢过程 Lignin catabolic process	21	6.65E-06
A-E	GO:0005992	海藻糖生物合成过程 Trehalose biosynthetic process	19	1.87E-06
A-E	GO:0071478	细胞对辐射的响应 Cellular response to radiation	22	2.64E-06
A-E	GO:0071214	细胞对非生物胁迫的响应 Cellular response to abiotic stimulus	22	4.18E-06
A-E	GO:0044767	单一有机体发育过程 Single-organism developmental process	214	8.24E-06
A-E	GO:0032502	发育过程 Developmental process	220	9.83E-06
B-C	GO:0055085	跨膜转运 Transmembrane transport	230	1.21E-14
B-C	GO:0006811	离子转运 Ion transport	173	1.54E-10
B-C	GO:0006820	阴离子转运 Anion transport	78	2.58E-10
B-C	GO:1903825	有机酸跨膜转运 Organic acid transmembrane transport	42	4.73E-09

续表 5

比较组 Comparison Groups	GO编号 GO ID	GO条目 GO Term	基因数量 Gene Number	P值 P-Value
B-C	GO:1905039	羧酸跨膜转运 Carboxylic acid transmembrane transport	42	4.73E-09
B-C	GO:0003333	氨基酸跨膜转运 Amino acid transmembrane transport	39	7.16E-09
B-C	GO:0006865	氨基酸转运 Amino acid transport	39	2.11E-08
B-C	GO:0006810	转运 Transport	424	2.33E-08
B-C	GO:0051234	定位的建成 Establishment of localization	427	5.56E-08
B-C	GO:0051179	定位 Localization	436	9.61E-08
D-E	GO:0080022	初生根发育 Primary root development	12	1.52E-09
D-E	GO:0006642	甘油三酯动员 Triglyceride mobilization	7	7.18E-06
D-E	GO:0009658	叶绿体组织 Chloroplast organization	35	7.27E-06
D-E	GO:0048506	分生组织相变时间调控 Regulation of timing of meristematic phase transition	9	8.33E-06

表 6 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 显著富集结果

Table 6 Significantly enriched KEGG pathways for DE miRNA target genes in different comparison groups

比较组 Comparison Groups	KEGG途径 KEGG Pathway	途径ID Pathway ID	基因数量 Gene Number	P值 P-Value
A-B	糖基磷脂酰肌醇 (GPI) -锚定生物合成 Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	ko00563	10	0.000 709 3
	脂肪酸延伸 Fatty acid elongation	ko00062	18	0.001 981 2
	2-羧基甲酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	ko01210	22	0.002 790 1
	氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	ko01230	69	0.003 417 7
	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	ko00220	14	0.004 281 4
	单环菌素生物合成 Monobactam biosynthesis	ko00261	6	0.007 604 3
	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	ko00591	7	0.007 743 9
	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	48	0.010 722 2
	黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis	ko00944	3	0.013 592 9
	真核生物中的核糖体生物发生 Ribosome biogenesis in eukaryotes	ko03008	28	0.015 049 1
	植物昼夜节律 Circadian rhythm - plant	ko04712	14	0.020 296 1
	油菜素内酯生物合成 Brassinosteroid biosynthesis	ko00905	5	0.031 256 2
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	ko00071	13	0.048 351 3	
A-C	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	38	7.98E-06
	蛋白质输出 Protein export	ko03060	16	3.14E-04
	植物昼夜节律 Circadian rhythm - plant	ko04712	11	1.99E-03
	DNA复制 DNA replication	ko03030	14	3.38E-03
	RNA聚合酶 RNA polymerase	ko03020	8	2.56E-02
A-D	磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	ko00562	39	1.93E-06
	异喹啉生物碱的生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ko00950	16	1.59E-04
	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	ko00051	33	3.64E-03
	自噬-其他真核生物 Autophagy - other eukaryotes	ko04136	15	4.63E-03
	类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	ko00906	16	9.62E-03
	酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	ko00072	5	2.43E-02
	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	ko04070	28	2.50E-02



续表 6

比较组 Comparison Groups	KEGG途径 KEGG Pathway	途径ID Pathway ID	基因数量 Gene Number	P值 P-Value
A-D	维生素B6代谢 Vitamin B6 metabolism	ko00750	8	2.85E-02
	赖氨酸降解 Lysine degradation	ko00310	17	2.89E-02
	玉米素生物合成 Zeatin biosynthesis	ko00908	10	3.33E-02
	醚脂质代谢 Ether lipid metabolism	ko00565	13	4.62E-02
A-E	醚脂质代谢 Ether lipid metabolism	ko00565	16	0.000 205 9
	非同源末端连接 Non-homologous end-joining	ko03450	7	0.000 579 5
	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ko00500	51	0.000 857 3
	类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	ko00906	15	0.001 705 1
	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	ko00564	35	0.003 838 6
	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	55	0.004 486 4
	玉米素生物合成 Zeatin biosynthesis	ko00908	9	0.016 233 1
	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	ko00051	23	0.036 076 3
B-C	脂肪酸延伸 Fatty acid elongation	ko00062	18	0.000 833 6
	黄酮合黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis	ko00944	3	0.010 997 1
	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	ko00591	6	0.019 886 3
	其他聚糖降解 Other glycan degradation	ko00511	7	0.048 730 9
	2-羧基甲酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	ko01210	17	0.041 135 3
D-E	磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	ko00562	38	1.79E-06
	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	ko04070	31	2.35E-03
	异喹啉生物碱的生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ko00950	12	9.65E-03
	磷酸酯和次磷酸酯代谢 Phosphonate and phosphinate metabolism	ko00440	6	8.31E-03
	鞘糖脂生物合成-乳糖和新乳糖系列 Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	ko00601	2	1.27E-02
	RNA转运 RNA transport	ko03013	59	1.57E-02
	组氨酸代谢 Histidine metabolism	ko00340	9	2.64E-02
	氮代谢 Nitrogen metabolism	ko00910	15	2.09E-02
	$\beta$ -丙氨酸代谢 Beta-Alanine metabolism	ko00410	17	2.67E-02
	叶酸合成 Folate biosynthesis	ko00790	9	4.69E-02

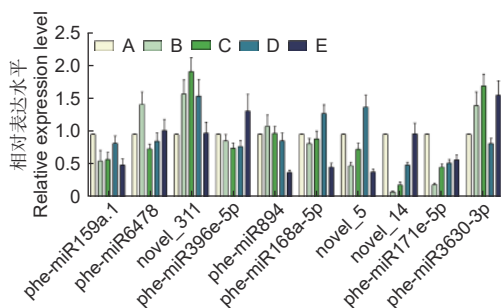


图 4 差异表达 miRNA 的 qPCR 验证

Fig. 4 qPCR validation for DEmiRNAs

能在毛竹种子萌发中有重要作用, 其中, miR159<sup>[36]</sup>、miR156<sup>[37]</sup>、miR396<sup>[38]</sup>、miR160<sup>[17]</sup> 已经被证明参

与了种子萌发调控。在大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 萌发种子中, miR156、miR166、miR167、miR168 等也具有高表达水平, 同时 miR5071 被大量积累, 而在本研究中未检测到 miR5071 的表达, 表明不同物种间 miRNA 对种子萌发的调控具有特异性<sup>[39]</sup>。在已有研究中, miR402<sup>[40]</sup>、miR163<sup>[41]</sup> 和 miR417<sup>[42]</sup> 被证明能够参与种子萌发期的干旱或盐胁迫响应, 而在本研究对照和处理组中均未检测到 miR402、miR163 和 miR417 的表达, 推测这些 miRNA 在本研究中可能不是响应干旱或盐胁迫的关键 miRNA, 其分布和表达可能与物种有关。

与对照组相比, 本研究中 miRNA 主要在单一胁迫下显著差异表达, 仅有 2 个 miRNA 能够同时

响应 2 种胁迫, 表明 miRNA 在 10% PEG、15% PEG、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 4 种胁迫下的调控存在差异。本研究丰度较高且显著差异表达的 miRNA 中, phe-miR171e-5p 能够响应 10% PEG 和 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫, phe-miR3630-3p 在 15% PEG 胁迫下显著上调表达, phe-miR159a.1 在 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下差异表达, 推测这 3 个 miRNA 对于毛竹种子萌发响应 PEG 或 NaCl 胁迫可能具有重要意义。

前人的研究中, PEG 胁迫下甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 萌发种子中的 miR171 比对照组显著下调表达<sup>[43]</sup>; 此外, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中过表达桑树 (*Morus alba* L.) mno-miR171 可提高转基因植株在 NaCl 和甘露醇胁迫下的种子发芽率<sup>[44]</sup>, 这与本研究 phe-miR171e-5p 能够响应 PEG 和 NaCl 胁迫是一致的。miR171 主要通过靶向 GRAS 家族基因影响 GA 和 ABA 信号通路, 参与胚胎发生潜能的维持<sup>[45-47]</sup>、花药发育、芽分枝和复叶形态的调控<sup>[48]</sup>、顶端优势的调控<sup>[49]</sup>等, 其是否通过 GRAS 家族参与毛竹种子萌发过程中对干旱和盐胁迫的调控需要进一步研究。在苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 中, miR3630 被鉴定为响应干旱胁迫的 miRNA<sup>[50]</sup>, 本研究中 phe-miR3630-3p 在 15% PEG 胁迫下显著上调表达, 但目前关于 miR3630 的研究较少, 本研究为 miR3630 响应干旱胁迫提供了新的证据。此外, phe-miR159a.1 在 A-E 比较组显著下调。拟南芥中 miR159 通过介导 GAMYB 家族 MYB101 和 MYB33 的转录本切割, 参与种子萌发过程糊粉层细胞的细胞程序性死亡<sup>[18]</sup>, 推测 miR159 对于 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下毛竹种子的萌发也可能具有重要的调控作用。

## 4 结 论

本研究首次系统鉴定了毛竹萌发种子中的 miRNA, 并对其在 PEG 和 NaCl 胁迫下毛竹萌发露白阶段种子中的表达模式进行研究, 探究了响应不同 PEG 和 NaCl 胁迫的差异表达 miRNA。下一步将对本研究中涉及的重要 miRNA 进行靶基因的验证, 并对其调控机制和调控功能进行深入研究和探讨。

## 参 考 文 献:

[1] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002: 221-352.

[2] 汪奎宏, 黄伯惠. 中国毛竹[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1996: 1-29.

[3] 谭宏超, 陶现灵, 谭汝强. 13种竹种子低温储存条件及种子育苗环境研究[J]. 世界竹藤通讯, 2018, 16(1): 16-20.

[4] 姚文静, 王 茹, 王 星, 等. 毛竹实生苗生长发育规律及其模型拟合研究[J]. 西部林业科学, 2020, 49(3): 14-20, 28.

[5] 张金菊, 张国敏, 贾碧玉, 等. 毛竹种子育苗技术初探[J]. 现代园艺, 2015(12): 26.

[6] ACOSTA-MOTOS J, ORTUÑO M, BERNAL-VICENTE A, et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. Agronomy, 2017, 7(1): 18.

[7] SINGH M, KUMAR J, SINGH S, et al. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2015, 14(3): 407-426.

[8] 张乃华, 汪爱君, 黄超刚, 等. 毛竹种子育苗造林技术[J]. 世界竹藤通讯, 2012(2): 32-34.

[9] 黄业伟, 杨 丽, 张智俊. NaCl胁迫对毛竹种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2009(10): 16-18.

[10] 宋沁春, 魏 开, 漆冬梅, 等. 盐胁迫下超声波处理对毛竹种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2018(3): 83-85.

[11] 杨振亚, 周本智, 周 燕, 等. PEG模拟干旱对毛竹种子萌发及生长生理特性的影响[J]. 林业科学研究, 2018, 31(6): 47-54.

[12] 蔡春菊, 范少辉, 曹帮华, 等. PEG和GA<sub>3</sub>引发处理对老化毛竹种子理化特性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(2): 40-46.

[13] ZHANG B H, PAN X P, COBB G P, et al. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact[J]. Developmental Biology, 2006, 289(1): 3-16.

[14] DONG Q K, HU B B, ZHANG C. MicroRNAs and their roles in plant development[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 824240.

[15] ISLAM W, ADNAN M, HUANG Z Q, et al. Small RNAs from seed to mature plant[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2019, 38(2): 117-139.

[16] DAS S S, KARMAKAR P, NANDI A K, et al. Small RNA mediated regulation of seed germination[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 828.

[17] LIU P, MONTGOMERY T A, FAHLGREN N, et al. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages[J]. Plant Journal, 2007, 52(1): 133-146.

[18] REYES J L, CHUA N. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination[J]. Plant Journal, 2007, 49(4): 592-606.

[19] ZHANG B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(7): 1749-1761.

[20] ZHAO H, WANG L, DONG L, et al. Discovery and comparative

- profiling of microRNAs in representative monopodial bamboo (*Phyllostachys edulis*) and sympodial bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*)[J]. PLoS ONE, 2014, 9(7): e102375.
- [21] GE W, ZHANG Y, CHENG Z, *et al.* Main regulatory pathways, key genes and microRNAs involved in flower formation and development of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(1): 82-96.
- [22] CHENG Z, HOU D, GE W, *et al.* Integrated mRNA, microRNA transcriptome and degradome analyses provide insights into stamen development in Moso Bamboo[J]. Plant and Cell Physiology, 2020, 61(1): 76-87.
- [23] WANG K L, ZHANG Y, ZHANG H M, *et al.* MicroRNAs play important roles in regulating the rapid growth of the *Phyllostachys edulis* culm internode[J]. New Phytologist, 2021, 231(6): 2215-2230.
- [24] JIN Q, PENG H, LIN E, *et al.* Identification and characterization of differentially expressed miRNAs between bamboo shoot and rhizome shoot[J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(4): 322-335.
- [25] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 42(D1): D68-D73.
- [26] KALVARI I, NAWROCKI E P, ONTIVEROS-PALACIOS N, *et al.* Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D192-D200.
- [27] FRIEDLNDER M R, MACKOWIAK S D, NA L, *et al.* MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. Nucleic Acids Research, 2012(1): 37-52.
- [28] WEN M, SHEN Y, SHI S, *et al.* MiREvo: an Integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments[J]. BMC Bioinformatics, 2012, 13(1): 140.
- [29] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2009, 26(1): 139-140.
- [30] DAI X, ZHAO P X. PsRNATarget: a plant small rna target analysis server[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: W155-W159.
- [31] FAHLGREN N, CARRINGTON J C. MiRNA target prediction in plants[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J. ), 2010, 592: 51-57.
- [32] KANEHISA M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(90001): 277D-280D.
- [33] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, *et al.* Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11(2): R14.
- [34] 黄志明, 李晨曦, 陈磊, 等. 毛竹4个miRNA在胚芽萌发过程的表达响应研究[J]. 热带作物学报, 2017, 38(11): 2112-2118.
- [35] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [36] ALEX D, BACH T J, CHYE M L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-Responsive[J]. Plant Journal, 2000, 22(5): 415-426.
- [37] NONOGAKI H. MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(11): 1840-1846.
- [38] LU Y, FENG Z, MENG Y, *et al.* SLENDER RICE1 and *Oryza sativa* INDETERMINATE DOMAIN2 regulating osmiR396 are involved in stem elongation[J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2213-2227.
- [39] BAI B, SHI B, HOU N, *et al.* MicroRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 150.
- [40] KIM J Y, KWAK K J, JUNG H J, *et al.* MicroRNA402 affects seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions via targeting Demeter-Like Protein3 mRNA[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(6): 1079-1083.
- [41] CHUNG P J, PARK B S, WANG H, *et al.* Light-inducible miR163 targets *PXMT1* transcripts to promote seed germination and primary root elongation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2016, 170(3): 1772-1782.
- [42] JUNG H J, KANG H. Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(10-11): 805-811.
- [43] JIAN H, WANG J, WANG T, *et al.* Identification of rapeseed microRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 658.
- [44] SUN Z, KUMAR R M S, LI J, *et al.* In silico search and biological validation of microR171 family related to abiotic stress response in mulberry (*Morus alba*)[J]. Horticultural Plant Journal, 2022, 8(2): 184-194.
- [45] ZANG Q, ZHANG Y, HAN S, *et al.* Transcriptional and post-transcriptional regulation of the miR171-*LaSCL6* module during somatic embryogenesis in *Larix kaempferi*[J]. Trees, 2021, 35(1): 145-154.
- [46] LI H, ZHANG J, YANG Y, *et al.* MiR171 and its target gene *SCL6* contribute to embryogenic callus induction and torpedo-shaped embryo formation during somatic embryogenesis in two lily species[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 130(3): 591-600.
- [47] SHI Q, LONG J, YIN Z, *et al.* MiR171 modulates induction of

somatic embryogenesis in *Citrus callus*[J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(6): 1403-1415.

[48] KRAVCHIK M, STAV R, BELAUSOV E, *et al.* Functional characterization of microRNA171 family in tomato[J]. *Plants*, 2019, 8(1): 10.

[49] JIANG S, CHEN Q, ZHANG Q, *et al.* Pyr-miR171f-targeted

*PyrSCL6* and *PyrSCL22* genes regulate shoot growth by responding to IAA signaling in pear[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2018, 14(2): 20.

[50] LI Y, WAN L, BI S, *et al.* Identification of drought-responsive microRNAs from roots and leaves of alfalfa by high-throughput sequencing[J]. *Genes*, 2017, 8(4): 119.

## Identification of MicroRNAs during Seed Germination and Its Response to PEG and NaCl Stresses

WANG Xiao-jing<sup>1,4</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, YANG Kai<sup>3</sup>, LI Lu-bin<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing Floriculture Engineering Technology Research Centre, Beijing Botanical Garden, Beijing 100093, China; 3. College of Plant Science and Technology, Beijing Agriculture University, Beijing 100096, China; 4. Life Sciences Department, Yuncheng University, Yuncheng 044011, Shanxi, China)

**Abstract:** [Objective] To identify microRNAs (miRNAs) and reveal its expressional pattern in seed coat rupture stage of Moso bamboo seeds (*Phyllostachys edulis*) under different drought and salt stresses.

[Methods] Polyethylene glycol (PEG6000) and NaCl were used to simulate drought and salinity stress, respectively. Small RNA libraries were separately built for Moso bamboo seeds germinated under H<sub>2</sub>O, 10% PEG, 15% PEG, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl and 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, and the seeds were all sampled at seed coat rupture stage. High throughput sequencing and bioinformatics analysis were used to explore the expressional pattern of miRNA. [Results] A total of 246 known miRNAs and 262 novel mature miRNAs were identified in this study. The most abundant miRNAs in seed coat rupture stage of Moso bamboo was miR166, followed by miR159, miR6478, miR319, etc. According to miRNA target prediction, MIR396 family owned the largest number of target genes, and *ph02gene13935* (*GAMYB*) could to be regulated by 28 miRNAs of MIR159, MIR319 or MIR396; A total of 181 differentially expressed miRNAs (DEmiRNA) were identified in six comparison groups; Compared with control group, in 10% PEG, 15% PEG, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl and 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl treatments, phe-miR171e-5p, phe-miR3630-3p, phe-miR171e-5p and phe-miR159a were differentially expressed respectively with highest expressional level in known miRNAs; The target genes of DEmiRNA were significantly enriched in different GO and KEGG pathways; Ten DEmiRNAs were verified by qPCR, and the overall trend of qPCR results was consistent with the sequencing data. [Conclusion] In seed coat rupture stage of moso bamboo, there exhibit high accumulation of known miRNAs such as miR159, miR6478, miR319 in all control and four treatment groups, which may play a conservative regulatory role in Moso bamboo seed germination. Compared with the control group, phe-miR171e-5p, phe-miR3630-3p, phe-miR171e-5p and phe-miR159a 1 are differentially expressed in 10% PEG, 15% PEG, 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl and 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, respectively, which can respond to PEG or NaCl stress during seed coat rupture stage of Moso bamboo.

**Keywords:** Moso bamboo; germination; PEG; NaCl; miRNA