

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.20216

许景垚, 单春苗, 单婷玉, 赵历强, 马克龙, 吴家文. 基于小 RNA 测序的风轮菜 microRNA 及其靶基因分析[J]. 植物科学学报, 2022, 40(2): 216-228

Xu JY, Shan CM, Shan TY, Zhao LQ, Ma KL, Wu JW. Analysis of microRNAs and their target genes in *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze using small RNA sequencing[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(2): 216-228

基于小 RNA 测序的风轮菜 microRNA 及其靶基因分析

许景垚^{1,2}, 单春苗^{1,2}, 单婷玉^{1,2}, 赵历强^{1,2}, 马克龙^{3*}, 吴家文^{2,4,5*}

(1. 安徽中医药大学研究生院, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学科研实验中心, 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 合肥 230012; 4. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 5. 安徽省中医药科学院, 合肥 230012)

摘要: 本研究以风轮菜 (*Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze) 为材料, 采用 BGISEQ-500 测序平台对风轮菜根、茎和叶的小 RNA 进行转录组测序, 并对其黄酮类物质合成途径中参与调控的 microRNA(miRNA) 及其靶基因进行了分析。结果显示, 鉴定出的保守 miRNA 有 86 个, 属于 26 个家族, 新发现 miRNA 8 个, 筛选出风轮菜黄酮类物质合成途径中调控 3 个关键酶的候选 miRNA(novel_mir3, miR167d-5p, miR396h)。通过对靶基因编码的关键酶 4-香豆酸辅酶 A 连接酶进行序列分析和同源建模, 发现其具有高度保守的底物结合区域、催化结构域及两个保守的肽基序。

关键词: 风轮菜; 转录组测序; miRNA; 黄酮; 4-香豆素辅酶 A 连接酶

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)02-0216-13

Analysis of microRNAs and their target genes in *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze using small RNA sequencing

Xu Jing-Yao^{1,2}, Shan Chun-Miao^{1,2}, Shan Ting-Yu^{1,2},
Zhao Li-Qiang^{1,2}, Ma Ke-Long^{3*}, Wu Jia-Wen^{2,4,5*}

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. Clinical College of Anhui Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hefei 230012, China; 4. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012; 5. Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

Abstract: To analyze the flavonoid biosynthesis pathway in *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and to explore the role of microRNAs (miRNAs) in target gene regulation, transcriptome sequencing of small RNAs (sRNAs) in the roots, stems, and leaves of *C. chinense* was carried out using the BGISEQ-500 platform. In total, 86 conserved miRNAs were identified, divided into 26 families, and eight novel miRNAs were predicted. Three candidate miRNAs (novel_mir3, miR167d-5p, and miR396h) and their target genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway were screened out. Sequence analysis and homologous modeling of 4-coumarate-CoA ligase, a key enzyme encoded by a target gene, showed that it

收稿日期: 2021-09-13, 修回日期: 2021-12-30。

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(2008085MH268, 2108085MH315); 国家重点研发计划项目(2017YFC1701600); 安徽中医药大学国家项目培养基金项目(2020PY02); 安徽高校自然科学研究项目(KJ2019A0476)。

This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Anhui Province of China (2008085MH268, 2108085MH315), National Key R&D Program of China (2017YFC1701600), National Project Training Fund of Anhui University of Traditional Chinese Medicine (2020PY02), and Natural Science Research Grant of Higher Education of Anhui Province (KJ2019A0476)。

作者简介: 许景垚(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中草药分子生物学(E-mail: 737126233@qq.com)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: makelong210@126.com; wujiawen@ahctcm.edu.cn)。

had two conserved peptide motifs and a highly conserved substrate binding groove and catalytic domain. This research lays a foundation for functional genomics study of *C. chinense* and understanding the regulation mechanism of flavonoid biosynthesis.

Key words: *Clinopodium chinense*; RNA sequencing; miRNA; Flavonoids; 4-Coumarate-CoA ligase

风轮菜 (*Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze), 是唇形科风轮菜属植物, 主要分布于江西、福建和安徽等地区, 中国药典将风轮菜和荫风轮一起收录为断血流的原植物^[1]。风轮菜具有止血、抗炎抑菌的作用^[2]。黄酮及皂苷类物质是风轮菜属植物发挥药理作用的有效成分^[3, 4]。近年来, 黄酮类物质的抗菌、抗病毒和抗心血管疾病等广谱药理作用已经得到了医学界的肯定^[5]。

櫻桃苷、芹菜素、木犀草素、圣草酚和二氢槲皮素是苯丙氨酸经过一系列酶促反应之后生成的黄酮类物质。其中关键酶 4-香豆素辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-CoA ligase, 4CL) 作为苯丙烷类代谢途径上的最后一个催化反应的酶, 控制下游代谢支路^[6]。

microRNA (miRNA) 是长度在 20 ~ 24 个核苷酸 (Nucleotide, nt) 的一类内源性小分子单链 RNA (small RNA, sRNA), 结构保守, 主要通过互补的转录本结合调控基因的表达^[7]。miRNA 属于负调控因子, 无编码蛋白质的能力, 在植物体内通过调节对应的靶基因参与萜类、黄酮类和生物碱等次生代谢物的积累, 是重要的调控因子^[8]。

转录组学连接基因组的遗传信息和蛋白组学的生物功能, 是发掘功能基因、蛋白质结构、功能研究的开端。转录组测序技术 (RNA sequencing, RNA-Seq) 具有高通量、成本低、灵敏度高的特点。随着二代测序技术的广泛应用, 通过转录组测序技术挖掘中草药活性成分合成的相关基因及代谢通路有助于理解其药用成分积累的调控机制。目前在很多中草药如玉竹 (*Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce)、多花黄精 (*Polygonatum cyrtone-ma* Hua) 和细风轮 (*Clinopodium gracile* (Benth.) Matsum) 中得到了广泛应用^[9-11]。

转录组测序技术也促进了 miRNA 调控活性的研究, 近年来苍耳 (*Xanthium strumarium* L.)、三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 和大叶相思 (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.)

及马占相思 (*Acacia mangium* Willd.) 等多种植物的 miRNA 也被陆续挖掘, 促进了 miRNA 对苍耳中的萜类、三七中的皂苷、大叶相思及马占相思中黄酮类物质的生物合成调控机制的解析^[12-14]。通过转录组测序技术发掘 miRNA 并对其靶基因功能进行预测, 对于 miRNA 介导的次生代谢物的生物合成调控非常重要。

本课题组前期完成了风轮菜 mRNA 测序及分析, 获得了基因编码序列及其不同器官基因表达模式^[15]。本研究利用 BGISEQ-500 高通量测序技术对风轮菜根、茎和叶 3 个器官的小 RNA 进行转录组测序, 鉴定保守的 miRNA 和新 miRNA, 使用 TPM (Transcripts per million) 标准化 miRNA 水平以消除建库时 PCR 扩增不一致导致的拷贝数差异^[16], 分析 miRNA 基因表达谱, 并鉴定参与黄酮类物质积累的候选 miRNA 及对应的靶基因, 以期对风轮菜黄酮类物质合成途径的解析及调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

风轮菜植株采自安徽中医药大学少荃湖校区药园, 经安徽中医药大学杨青山教授鉴定为唇形科风轮菜属植物风轮菜。选择新鲜无病虫害的风轮菜植株洗干净后, 分离根、茎、和叶各器官, 再使用蒸馏水冲洗后用滤纸将其擦干分别放入离心管中, 立刻放入液氮中冷冻, 固样后放入 -80℃ 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取、sRNA 库构建和测序

使用植物 RNA 提取试剂盒分别从根、茎和叶中分离出总 RNA。RNA 的质量使用 Agilent 2100 生物分析仪进行检测。纯化后的 RNA 用于构建 sRNA 文库, 并使用 BGISEQ-500 平台进行测序。

1.3 原始数据处理

通过高通量测序获得的 RNA 原始测序数据, 首先去掉低质量序列、接头和其他污染序列, 最终得到高质量的序列, 并且对 sRNA 序列的数目和种

类以及长度分布进行统计。

1.4 sRNA 注释和 miRNA 预测

使用 AASRA^[17] 比对软件, 将高质量的序列比对到风轮菜 mRNA 数据和小 RNA 数据库, 风轮菜小 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/>) 的顺序注释。使用 miRA^[18] 和 miRDeep2^[19] 软件对风轮菜 miRNA 进行预测。由于 miRNA 的前体序列可以形成发夹状二级结构, miRA 软件可识别植物中的 miRNA 前体, 并评估前体二级结构; miRDeep2 是分析已知 miRNA 和新 miRNA 的工具。

1.5 差异表达 miRNA 的筛选和聚类分析

使用 TPM^[16] 标准化 sRNA 的表达水平, 标准化后的数据用于差异比较分析, 计算方式为“比对到某一 miRNA 的序列数目 $\times 10^6$ / 比对到所有 miRNAs 上的序列数目”。对差异检验的 *P*-value 作多重假设检验校正^[20], 使用 FDR (False discovery rate, FDR) 错误控制法确定 *P*-value 的域值^[21]。基于泊松分布的原理, 分析 3 个器官的差异表达 miRNA (Differentially expressed miRNA, DEM), 差异表达倍数可根据 TPM 值、FDR 值和 $\log_2 |FC|$ 来计算, 其中 $FDR \leq 0.001$, 且 $\log_2 |FC| \geq 2$ 归为差异表达的 miRNA。本研究对风轮菜中 DEM 使用 R 软件 v1.0.12^[22] pheatmap 函数进行聚类分析, 多组 DEM 一同聚类时, 组间交集与并集 DEM 将会被单独进行聚类。

1.6 miRNA 靶基因预测及靶基因的 GO 和 KEGG pathway 功能富集分析

采用 psRobot^[23] 和 Target Finder^[24] (-c4) 软件预测风轮菜 miRNA 的靶基因, 结合自由能、得分值等过滤条件进行过滤, 两个软件预测的结果取交集作为最终结果。使用在线网站 TarDB (<http://www.biosequencing.cn/TarDB>)^[25] 对目标 miRNA 进行靶基因预测。

将 DEMs 对应的靶基因比对到 GO (<http://www.geneontology.org/>) 数据库中, 进行 GO 功能显著性富集, 分析它们的生物学功能 (*P*-value ≤ 0.05)。根据 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 有关途径的主要公共数据库对 DEMs 对应的靶基因进行注释, 确定靶基因显著性富集的途径 (Q-

value ≤ 0.05)。

1.7 4CL 的结构特征分析

通过 Getorf 3.0^[26] 软件检测风轮菜 4CL 的全长开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 用 MEGA5.0^[27] 和 CLUSTALX1.83^[28] 软件对筛选出的 4CL 的氨基酸序列进行比对寻找保守的活性位点, 通过 ESPrnt3.0 (<http://esprnt.lbcpr.fr/ESPrnt/cgi-bin/ESPrnt.cgi>)^[29] 在线网站显示 4CL 二级结构, 采用 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>)^[30, 31] 在线软件对风轮菜 4CL 同源建模, 用 Pymol^[32, 33] 软件描绘风轮菜 4CL 的空间结构。

2 结果与分析

2.1 风轮菜的高通量测序数据分析

本研究从风轮菜根、茎和叶的 cDNA 文库中测序产生了约 1.25×10^8 条原始数据, 去掉低质量序列、接头和其他污染序列后, 根、茎和叶分别得到 33 795 837、38 882 218 和 37 952 039 条高质量序列, 且 3 个样品 Q20 均超过 99%。

2.2 sRNA 长度分析与 sRNA 分类注释

风轮菜根、茎和叶 sRNA 文库序列长度分布表现出一致性, 21 nt 的 sRNA 最丰富, 其次是 22 和 24 nt sRNA。21 nt sRNA 分别占根、茎和叶 sRNA 的 17.28%、30.36% 和 39.89%; 22 nt sRNA 分别占根、茎和叶 sRNA 的 14.35%、20.87% 和 17.47%; 24 nt sRNA 分别占根、茎和叶 sRNA 的 18.47%、17.90% 和 12.52% (图 1)。

本研究将高质量序列同 miRBase、Rfam、siRNA、和 snoRNA 等已知的 sRNA 数据库进行比对, 在叶中注释到 miRNA 4 029 583 个, 占 sRNA 总数的 10.62%; 在根中注释到 miRNA 1 585 228 个, 占 sRNA 总数的 4.69%; 在茎中注释到 miRNA 3 117 880 个, 占 sRNA 总数的 8.02%。

2.3 保守的 miRNA 和新发现的 miRNA

在风轮菜中共鉴定出 86 个保守的 miRNA, 隶属于 26 个 miRNA 家族, 在根、茎、叶中分别有 83、81、75 个 miRNA (图 2: A)。保守的 miRNA 长度范围是 18 ~ 24 nt, 其中长度为 21 nt 的 miRNA 有 43 个 (占 50.00%), 长度为 20 nt 的 miRNA 有 24 个 (占 27.91%)。首位碱基偏好是尿嘧啶 (U), 在长度为 19、20、21、22 和 23 nt 的 miRNA

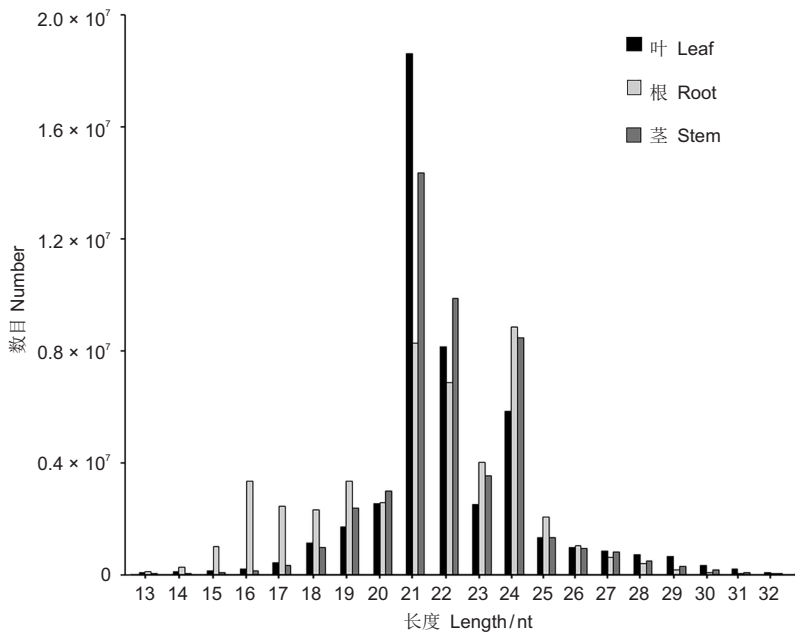
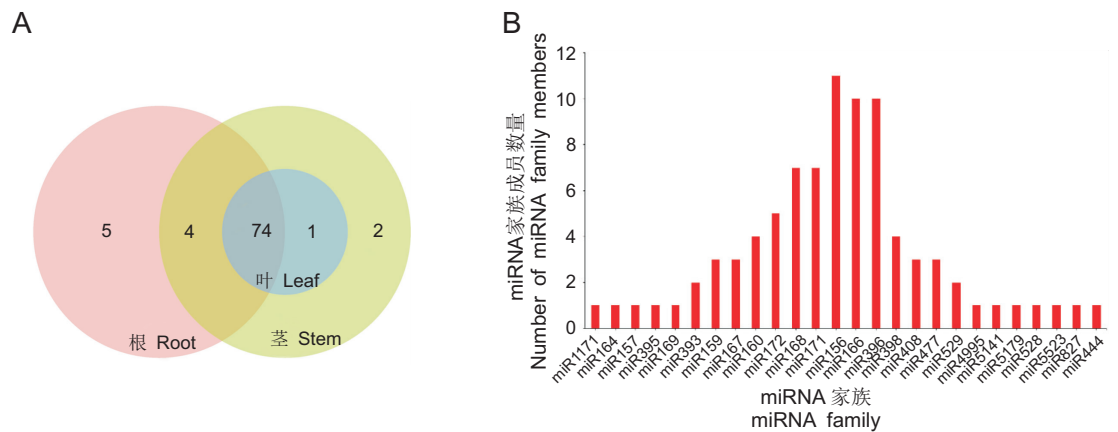


图 1 风轮菜 sRNA 长度分布

Fig. 1 Length distribution of sRNA in *Clinopodium chinense*



A: 风轮菜根、茎和叶中鉴定出的 miRNA 数量; B: miRNA 各家族成员数量。

A: Number of miRNAs identified in roots, stems, and leaves of *C. chinense*; B: Number of miRNA family members.

图 2 风轮菜 miRNA 的分布及种类

Fig. 2 Distribution and variety of miRNAs in *Clinopodium chinense*

中比例均超过 60%。保守的 miRNA 最大家族是有 11 个成员的 miR156，其次是各有 10 个成员的 miR396 和 miR166，另外 11 个家族含 2 ~ 7 个成员(图 2: B)。

为了在风轮菜中寻找新 miRNA，本研究使用 miRDeep2 和 miRA 来检测茎环发夹二级结构，并测量新 miRNA 序列的最小自由能。本研究发现 8 个新的具有发夹二级结构的 miRNA 候选物(图 3)，长度为 19 ~ 28 nt，每个新 miRNA 前体的长度范围为 82 ~ 229 nt，平均为 163 nt，核苷酸首位碱

基分布与保守的 miRNA 相似，第 1 个碱基偏好于尿嘧啶(U)。

2.4 根、茎和叶之间 miRNA 差异表达分析

表达水平相关性分析结果显示(图 4: A)，两两器官间 miRNA 表达均有差异。以根为对照，叶中有 51 条 DEMs，其中 22 条上调、29 条下调；以根为对照，茎中有 53 条 DEMs，其中 14 条上调、39 条下调；以茎为对照，叶中有 42 条 DEMs，其中 32 条上调、10 条下调(图 4: B)。

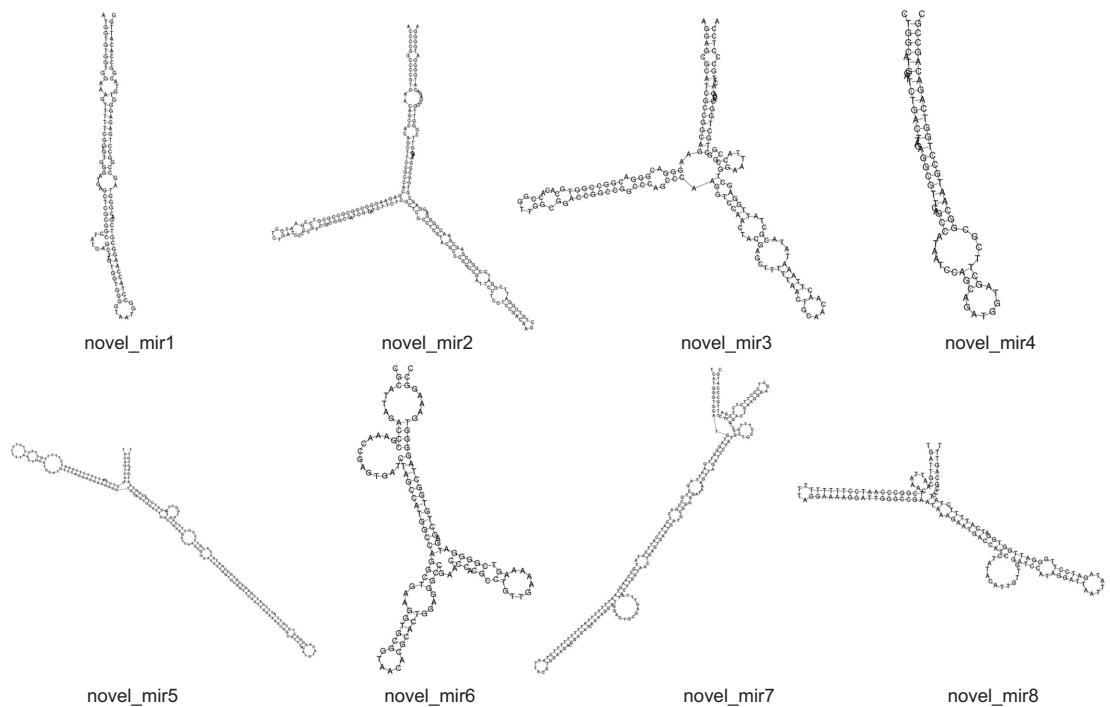
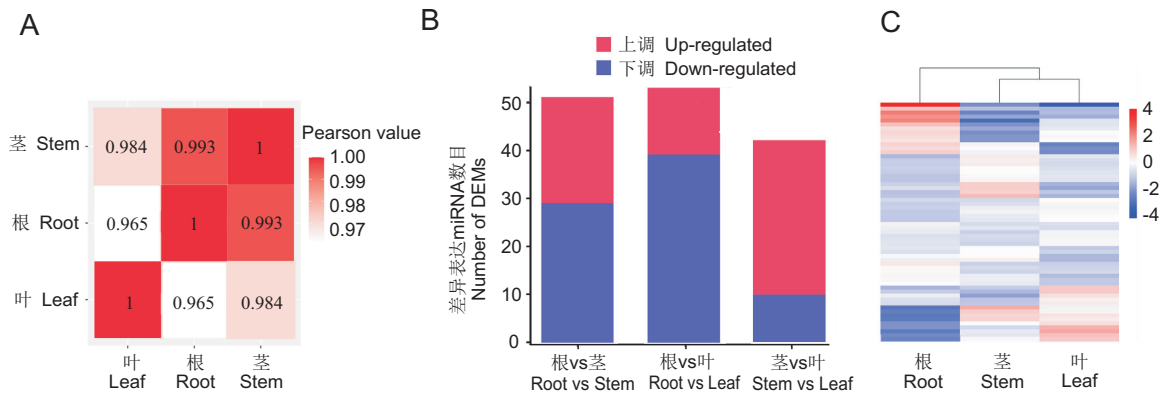


图 3 风轮菜中 8 个新 miRNA 的二级结构
Fig. 3 Secondary structures of eight novel miRNAs in *Clinopodium chinense*



A: 风轮菜器官间 miRNA 表达水平的相关性; B: 风轮菜两两器官比较 miRNA 表达上调和下调的数目; C: 风轮菜 3 种器官中表达水平的基因聚类热图。
A: Correlation of expression levels in three tissues of *C. chinense*; B: Number of up-regulated and down-regulated DEMs in root vs. leaf, root vs. stem, and stem vs. leaf datasets; C: Heat map of genes expressed in root, stem, and leaf tissues.

图 4 风轮菜器官间 miRNA 表达水平的相关性及 DEMs 的分析
Fig. 4 Expression analysis of correlation and differentially expressed miRNAs (DEMs) in *Clinopodium chinense* tissues

每个 miRNA 的丰度差异很大, miR166a-3p 在每个器官都是高表达, 而 miR396b-3p_1、miR5179、miR398a-3p_1 等 13 个 miRNA 在每个器官中均为低表达。我们过滤出表达量 (TPM 值) 均大于 1 的 miRNA 进行聚类, 进一步探索显著差异的 miRNA。结果发现, 茎和叶被聚类在一个分支上; 其中 miRNA160a-5p、miRNA171b-3p、

miRNA477a_4 和 miRNA167-5p 在茎和叶的表达量小于根; miRNA160、novel_mir8、miRNA396b-5p、miRNA396h、miRNA156、miRNA396g-3p、miRNA167d_1、miRNA393a、miRNA4995 在根的表达量小于茎和叶; 新 miRNA 在不同器官的表达量也有差异, novel_mir6 在叶的表达量远多于根, novel_mir7 在根的表达量大于叶, novel_mir2 在叶

中的表达量大于根和茎, novel_mir3 在茎中高表达 (图 4: C)。

2.5 miRNA 靶基因的预测

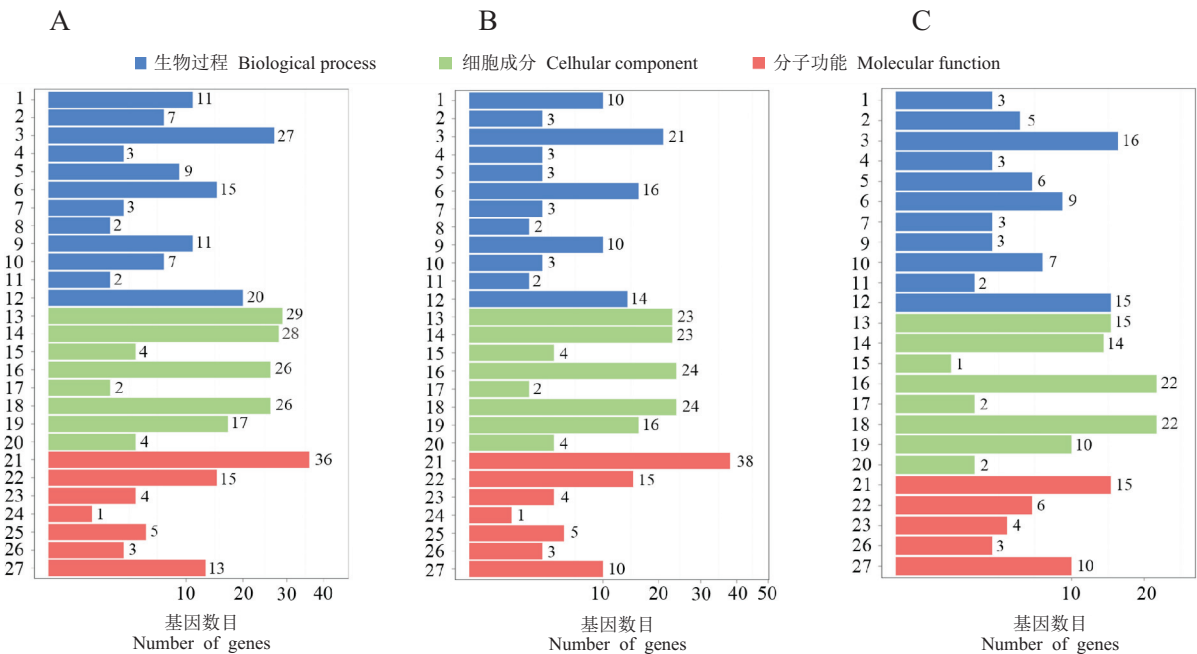
风轮菜靶基因预测结果表明, 79 个 miRNA 有 824 个靶基因, 这些 miRNA 的靶基因数目差距较大, 如 miR5658 的靶基因数目多达 254 个, 而 miR166d-5p_2、miR398b-3p_1、miR5523 和 novel_mir1 仅有 1 个靶基因, miRNA 通过调控多种基因, 介入到多种生物学途径, 显示 miRNA 调控靶基因的复杂性。

保守 miRNA 的靶基因可能参与各种生物过程, 如苯丙烷类化合物的生物合成是由 miR5658、miR172a_2、miR172a_3、miR172c-3p、miR172e-3p_1、miR167a_2、miR167d_1、miR167d-5p、miR156g_1 调节; miR395p-3p 参与调控花青素的

生物合成; 转录因子 GAMYB 编码基因被预测可能为 miR156z、miR159c_5 的靶点, 生长素响应因子 (Auxin response factor, ARF) 是 miR160a-5p、miR160b_1、miR160h_1、miR5658、miR167d_1d 的靶基因。对 novel miRNA 进行靶基因预测发现编码 4CL 的 CL5897-3 和 CL5897-4 是 novel-mir3 的靶基因, 其中 CL5897-4 编码 4CL 酶蛋白的完整读码框。

2.6 DEMs 靶基因 GO 显著性富集分析

为了深入了解 DEMs 的功能, 本研究基于 GO 分析鉴定了风轮菜根、茎和叶中 DEMs 的靶基因, 绘制两两器官之间 DEMs 靶基因的 GO 功能分类图, 阐明 DEMs 靶基因的功能分布特点 (图 5)。结果显示, 风轮菜 DEMs 对应的靶基因功能可归纳为生物过程, 细胞成分和分子功能 3 大



A: 茎与根比较 DEMs 靶基因功能分类; B: 叶与根比较 DEMs 靶基因功能分类; C: 叶与茎比较 DEMs 靶基因功能分类。
A: Functional classification of DEM target genes between stem and root; B: Functional classification of DEM target genes between leaf and root; C: Functional classification of DEM target genes between leaf and stem.
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: 定位; 6: 生物代谢进程; 7: 多细胞进程; 8: 生物过程的正向调节; 9: 生物过程的调节; 10: 对刺激的反应; 11: 信号传导; 12: 单一机体过程; 13: 细胞; 14: 细胞部分; 15: 大分子复合物; 16: 膜结构; 17: 膜关闭内腔; 18: 膜部分; 19: 细胞器; 20: 细胞器部分; 21: 结合; 22: 催化活性; 23: 电子载体活性; 24: 酶调节活性; 25: 分子转导活性; 26: 核酸结合转录因子活性; 27: 转运活性。
1: Biological regulation; 2: Cellular component organization or biogenesis; 3: Cellular process; 4: Developmental process; 5: Localization; 6: Metabolic organismal process; 7: Multicellular organismal process; 8: Positive regulation of biological process; 9: Regulation of biological process; 10: Response to stimulus; 11: Signaling; 12: Single-organism process; 13: Cell; 14: Cell part; 15: Macromolecular complex; 16: Membrane; 17: Membrane-enclosed lumen; 18: Membrane part; 19: Organelle; 20: Organelle part; 21: Binding; 22: Catalytic activity; 23: Electron carrier activity; 24: Enzyme regulator activity; 25: Molecular transducer activity; 26: Nucleic acid binding transcription factor activity; 27: Transporter activity.

图5 风轮菜两两器官 DEMs 靶基因 GO 功能分类

Fig. 5 GO functional classification for differentially expressed miRNA (DEM) target genes in *Clinopodium chinense*

类。比较茎和根，DEMs 靶基因 310 条，有 117 条被富集到“生物过程”，136 条被富集到“细胞成分”，77 条被富集到“分子功能”；比较叶和根，DEMs 靶基因 286 条，有 90 条被注释到“生物过程”，120 条被富集到“细胞成分”，76 条被富集到“分子功能”；比较叶和茎，DEMs 靶基因 198 条，有 72 条被注释到“生物过程”，88 条被富集到“细胞成分”，38 条被富集到“分子功能”。其中被富集到最多的是“细胞”、“结合功能”和“细胞组分”。此外，发现茎与根、叶与根的 DEMs 靶基因数目比茎与叶多，即地上部分的两器官之间差异基因较少。

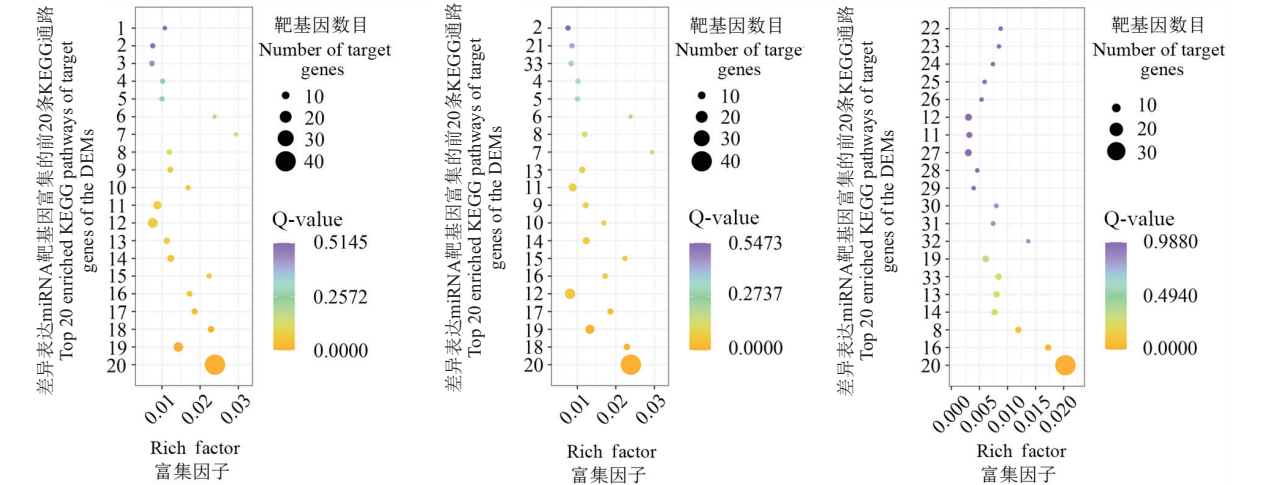
2.7 DEMs 靶基因 KEGG pathway 分析

KEGG pathway 分析结果表明，根和叶的 DEMs 靶基因富集于 252 条信号通路；根和茎的

DEMs 靶基因富集于 268 条信号通路；茎和叶的 DEMs 靶基因富集于 268 条信号通路。植物激素信号转导通路是两两器官间最主要富集的通路(图 6)。

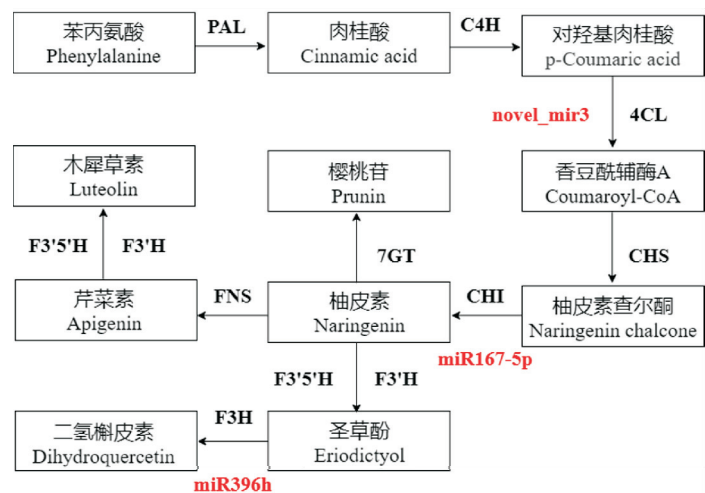
2.8 黄酮生物合成相关 miRNA 的筛选

风轮菜活性成分柚皮素、樱桃苷、芹菜素、木犀草素、圣草酚和二氢槲皮素均属于黄酮类物质，基于 mRNA 转录组 KEGG 分析^[15]，本研究发现 3 个 miRNA (novel_mir3、miR167d-5p、miR396h) 的 6 个靶基因编码黄酮类生物合成途径的 3 个关键酶。编码 4CL 酶的 CL5897.Contig3_All、CL5897.Contig4_All 是 novel_mir3 的靶点；编码 CHI 酶的 CL4612.Contig3_All、Unigene353_All 是 miR167d-5p 的靶点；编码 F3H 酶的 CL1796.Contig1_All、CL1796.Contig4_All 是 miR396h 的靶点(图 7、表 1)。



A: 叶与根比较 DEMs 靶基因显著富集途径; B: 茎与根比较 DEMs 靶基因显著富集途径; C: 叶与茎比较 DEMs 靶基因显著富集途径。
A: Significantly enriched pathways for DEMs in leaf vs. root tissues; B: Significantly enriched pathways for DEMs in stem vs. root tissues; C: Significantly enriched pathways for DEMs in leaf vs. stem tissues.
1: 硒化合物代谢; 2: 磷脂酰肌醇信号系统; 3: 真核生物核糖体合成; 4: 其他糖类降解; 5: 鞘脂代谢; 6: 赖氨酸生物合成; 7: 单内酰胺生物合成; 8: 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解; 9: 柠檬酸循环 (TCA 循环); 10: 糖胺聚糖降解; 11: mRNA 监控途径; 12: RNA 运输; 13: 甘油磷脂代谢; 14: 甘油酯代谢; 15: 鞘脂生物合成-神经节系列; 16: 丙酸代谢; 17: 赖氨酸降解; 18: 色氨酸代谢; 19: RNA 降解; 20: 植物激素信号转导; 21: 昼夜节律-植物; 22: 叶酸生物合成; 23: 倍半萜和三萜的生物合成; 24: 脂肪酸伸长; 25: 亚油酸代谢; 26: 不饱和脂肪酸生物合成; 27: 剪接体; 28: 酪氨酸代谢; 29: 苯丙氨酸代谢; 30: 光合作用; 31: 类黄酮生物合成; 32: 油菜素甾醇生物合成; 33: 过氧化物酶体。
1: Selenocompound metabolism; 2: Phosphatidylinositol signaling system; 3: Ribosome biogenesis in eukaryotes; 4: Other glycan degradation; 5: Sphingolipid metabolism; 6: Lysine biosynthesis; 7: Monobactam biosynthesis; 8: Valine, leucine, and isoleucine degradation; 9: Citrate cycle (TCA cycle); 10: Glycosaminoglycan degradation; 11: mRNA surveillance pathway; 12: RNA transport; 13: Glycophospholipid metabolism; 14: Glycerolipid metabolism; 15: Glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series; 16: Propanoate metabolism; 17: Lysine degradation; 18: Tryptophan metabolism; 19: RNA degradation; 20: Plant hormone signal transduction; 21: Circadian rhythm-plant; 22: Folate biosynthesis; 23: Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis; 24: Fatty acid elongation; 25: Linoleic acid metabolism; 26: Biosynthesis of unsaturated fatty acids; 27: Spliceosome; 28: Tyrosine metabolism; 29: Phenylalanine metabolism; 30: Photosynthesis; 31: Flavonoid biosynthesis; 32: Brassinosteroid biosynthesis; 33: Peroxisome.

图 6 风轮菜两两器官间比较 DEMs 靶基因 KEGG 途径富集
Fig. 6 KEGG annotation for differentially expressed miRNA (DEM) target genes in *Clinopodium chinense*
© Plant Science Journal <http://www.plantscience.cn>



PAL：苯丙氨酸裂解酶；C4H：肉桂酸 4-羟化酶；4CL：4-香豆素辅酶 A 连接酶；CHS：查尔酮合成酶；CHI：查尔酮异构酶；FNS：黄酮合成酶；F3'5'H：类黄酮-3'，5'-羟化酶；F3'H：类黄酮 3'-羟化酶；F3H：黄烷酮-3-羟化酶；7GT：黄烷酮 7-O-β-糖基转移酶。
PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-Coumarate-CoA ligase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; FNS: Flavone synthase; F3'5'H: Flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3'H: Flavonoid3'-hydroxylase; F3H: Flavanone3-hydroxylase; 7GT: Flavone7-O-beta-glucosyltransferase.

图 7 风轮菜黄酮类物质生物合成途径
Fig. 7 Biosynthesis pathway of flavonoids in *Clinopodium chinense*

表 1 编码黄酮类生物合成关键酶的 miRNA 及其靶基因
Table 1 miRNAs and their target genes encoding key enzymes in flavonoid biosynthesis pathway

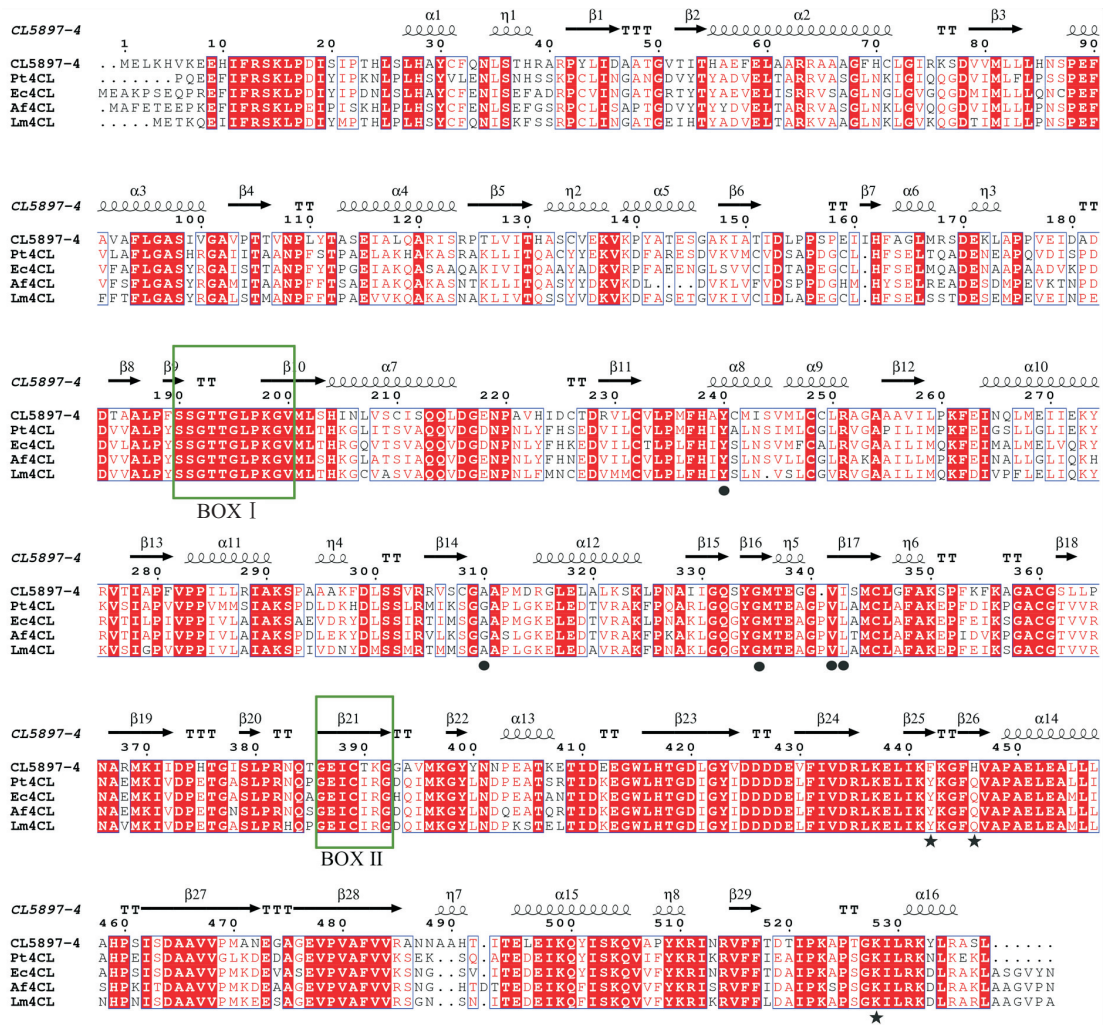
关键酶 Key enzyme	缩写 Abbreviation	ko 编号 ko ID	miRNA 名称 miRNA ID	靶基因名称 Target ID
4-香豆酸辅酶 A 连接酶	4CL	ko00940	novel_mir3	CL5897.Contig3_All CL5897.Contig4_All
查尔酮异构酶	CHI	ko00941	miR167d-5p	CL4612.Contig3_All Unigene353_All
黄烷酮 3-羟化酶	F3H	ko00941	miR396h	CL1796.Contig1_All CL1796.Contig4_All

2.9 4CL 的二级结构和空间结构分析

黄酮合成途径起始于苯丙氨酸的苯丙烷途径，4CL 是在苯丙烷途径最后一步发挥作用，是黄酮类物合成的关键酶^[34]。风轮菜 miRNA 的靶基因 CL5897-4 编码完整的 4CL，作者选择具有完整读码框的 CL5897-4 对 4CL 酶蛋白的结构和功能进行分析。风轮菜 4CL 与其他植物的 4CL 序列同源性很高，与已知序列的毛白杨 (*Populus tomentosa* Carrière, Pt) 4CL、赤桉 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., Ec) 4CL、紫穗槐 (*Amorpha fruticosa* L., Af) 4CL 和灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz., Lm) 4CL 的相似度均接近 60%。风轮菜 4CL 二级结构由 16 个 α-螺旋和 28 个 β-折叠组成，还具有 4CL 蛋白的 BOX I

“SSGTTGLPKGV” (S190-V200) 高度保守序列，BOX II “GEICTKG” (G386-G392) 保守序列^[35]，包括 5 个底物结合位点氨基酸 (Y240、A310、G335、V341、I342) 和 3 个催化活性必需的氨基酸 (K441、H446、K528) (图 8)。

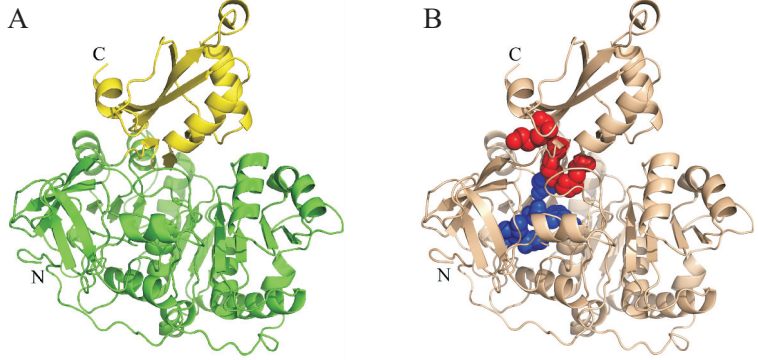
利用在线软件 SWISS-MODEL，以毛白杨 4CL 晶体结构 (PDB ID: 3a9v.1.A) 为模板，构建风轮菜 4CL 的空间结构模型，覆盖区域为 A8-A537。结果表明，风轮菜 4CL 与毛白杨 4CL 序列一致性达到 59.36%，ORF 长度为 1878 bp，编码 538 个氨基酸。二级结构主要由 16 个 α-螺旋和 28 个 β-折叠组成。N 端大亚基的 3 个亚结构域 (绿色示意) 及 C 端小亚基 (黄色示意) 均为 α 螺旋包裹着 β 折叠形成的夹心饼干样结构 (图 9: A)；底物结合



风轮菜 4CL 中的 BOX I 结构域和 BOX II 结构域用方框表示；星型示意底物结合位点，圆点示意催化活性必需的氨基酸。Domains of BOX I and BOX II in 4CL are indicated by boxes; Substrate binding sites are indicated using ‘★’; Amino acids essential for catalytic activity are indicated using ‘•’.

图 8 风轮菜 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的序列比对及蛋白二级结构

Fig. 8 Sequence alignment and secondary structure of 4CL in *Clinopodium chinense*



A: 风轮菜 4CL 空间结构模型(黄色和绿色分别是 N 端结构域和 C 端结构域)；B: 风轮菜 4CL 活性位点示意图(红色和蓝色球分别示意催化活性位点和底物结合位点的氨基酸)。
A: Tertiary structure model of 4CL in *C. chinense* (yellow and green are N-terminal domain and C-terminal domain, respectively)；B: Active sites of 4CL in *C. chinense* (red and blue balls are amino acids of catalytic active sites and substrate binding sites, respectively).

图 9 风轮菜 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的空间结构模型及活性位点

Fig. 9 Tertiary structure model and active sites of 4CL in *Clinopodium chinense*

位点的5个氨基酸和催化活性必需的3个氨基酸在空间结构上构成了特定的底物结合区域(蓝色示意)和催化区域(红色示意)(图9:B)。

3 讨论

风轮菜以往研究主要集中于有效成分和药理作用等方面^[2, 36]。本课题组前期研究了风轮菜mRNA转录组, 鉴定出风轮菜三萜皂苷生物合成中涉及编码关键酶的基因^[15]。本研究进一步利用高通量测序分析了风轮菜 miRNA 转录组, 鉴定了涉及黄酮生物合成的 miRNA 和相关靶基因, 为探索 miRNA 调控黄酮类物质生物合成奠定基础。

本研究构建了风轮菜叶、根和茎的3个 sRNA 文库, 总共得到超过 1.1×10^8 高质量序列并且3个样品 Q20 值均超过了 99%, 表明得到的测序数据质量较高。风轮菜的 sRNAs 的主要长度分布区间在 21 ~ 24 nt, 所占比例最高的是 21 nt sRNA, 这与人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)^[37]、玉米 (*Zea mays* L.)^[38] 类似。共鉴定出了 86 个保守 miRNA 和 8 个新发现的 miRNA, 多数为植物保守 miRNA。

风轮菜根、茎和叶的 miRNA 文库 phreatmap 层次聚类分析结果显示, 茎和叶聚类在同一个分支上, 表明这两种器官中基因的表达水平整体上更接近, 并且其中的 miRNA160a-5p、miRNA167d-5p、miRNA171b-3p 表达量在茎和叶中低于根, miRNA160、novel_miR8、miRNA396b-5p 表达量在根中低于茎和叶, 说明风轮菜 miRNA 在根、茎和叶3个器官具有不同的表达模式, 这些 miRNA 很可能与风轮菜地上部分次生代谢物的生物合成有重要的联系。

79 个 miRNA 进行靶基因共预测出 824 个靶基因, miRNA 和靶基因的关系具有多对多、一对多和一对一的特点, 此结果与孙平^[39]和 Zhang 等^[40]的研究一致, 说明 miRNAs 之间的功能具有一致性和特异性。风轮菜根、茎和叶3个器官两两比较, KEGG pathway 分析 DEMs 靶基因均主要集中在植物激素信号转导途径, 研究发现, 许多 miRNA 参与植物发育及种子内物质变化、积累、储藏等方面的调控作用^[41]。

CHI 是第一个被报道的黄酮物质合成相关酶^[42], 已有研究证实茶 (*Camellia sinensis* (L.)

O. Kuntze) miRNA167a 在转录后水平对 CHI 起负调控作用, 抑制 CHI 的表达^[39]; miR167 家族是种子发育过程中丰度最高的 miRNA 之一, miRNA167家族的靶基因 ARF 蛋白影响植物花和果实的发育^[43]; ARF 还可能与黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 黄酮生物合成途径中的关键酶 PAL 关系密切, 进而影响黄酮类化合物的积累^[44]。miR396 家族对生长调节因子 (Growth regulation factor, GRF) 进行转录后水平的抑制, 控制叶片的大小^[45], 在植物耐高温抗逆性方面有关键作用^[46], 促进合成较强的信号多肽多肽酶 (Signal peptide peptidase, SPP) 蛋白和基因沉默效应作用^[47]。研究发现, 大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 中的 miRNA396 家族靶向 UDP-葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (Flavonoid-3-O-glucosyltransferase, 3GT), 从而影响异黄酮的合成^[48]。根据软件 TarDB 的预测, 有研究发现 miR167 在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中的靶基因是 ARF, miR396 在水稻中的靶基因是 GRF^[49, 50], 说明同一类别的 miRNA 可能靶向不同的基因, 从而发挥不同的生物学功能。

本研究对风轮菜黄酮类物质生物合成途径进行分析, 鉴定出3个 miRNA (novel_mir3、miR167d-5p、miR396h) 参与调控黄酮类物质合成途径的3个关键酶 (4CL、CHI、F3H), 它们可能在风轮菜中调控黄酮的合成与积累, 风轮菜黄酮类物质含量可能是这些 miRNA 协同作用的结果, 但具体调控机制还有待深入研究。

4CL 作为控制苯丙烷代谢途径到黄酮类下游代谢分支的最后一个酶, 具有重要作用。有研究以桑 (*Morus alba* L.) 幼叶 cDNA 为模板克隆了桑 4CL 酶, 通过荧光定量 PCR 分析及桑叶总黄酮含量测定, 证明 4CL 酶的表达水平与总黄酮的含量有一定的关联^[51]; 也有研究通过控制青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. F) 4CL 的表达量从而影响黄酮类物质的合成^[52]; 对水稻、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 和毛白杨 (*Populus tomentosa* Carrière) 等模式植物的研究也同样证明, 黄酮类物质的表达量可以被 4CL 控制^[53]。

风轮菜中 4CL 酶有高度保守的底物结合区域和催化结构域, 但其保守序列 BOX I 和 BOX II 中

有些氨基酸出现变化的原因可能是由于遗传进化或者是与自身的功能有关。BOX I 是 AMP 结合功能域,是所有腺苷酸合成酶以及肽合成酶等共同的保守结构域,BOX II 直接参与催化反应,且与维持蛋白质空间构象有关^[6, 34]。近年来,随着基因测序技术的不断进步,越来越多物种的 4CL 酶被测序,为改良这些基因,调控它们的活性提供更多的研究基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 326.
- [2] 张冬玲, 何枢衡, 黄雁, 洪美闲, 吴建雄. 基于系统药理学分析断血流治疗出血性疾病的机制[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(6): 839–945.
Zhang DL, He SH, He Y, Hong MX, Wu JX. Research on the mechanism of Duanxueliu in the treatment of bleeding diseases based on system pharmacology[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2020, 35(6): 839–945.
- [3] 王圣男, 余世春, 许旭东, 余守军, 范石虎. 风轮菜属三萜皂苷与黄酮研究进展及波谱特征[J]. 波谱学杂志, 2013, 30(3): 447–460.
- [4] 苗得足, 高峰, 鞠建刚. 风轮菜中黄酮苷类化合物的结构鉴定[J]. 药学与临床研究, 2014, 22(4): 342–343.
Miao DZ, Gao F, Ju JG. Flavonoid glycosides from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze[J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2014, 22(4): 342–343.
- [5] 祁建宏, 董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 89–92.
Qi JH, Dong FX. Research progress on pharmacological action of flavonoids[J]. *Journal of Beijing Union University*, 2020, 34(3): 89–92.
- [6] 田晓明, 颜立红, 向光锋, 蒋利媛. 植物 4 香豆酸: 辅酶 A 连接酶研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 19–26.
Tian XM, Yan LH, Xiang GF, Jiang LY. Research progress on 4-Coumarate: coenzyme A ligase(4CL) in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 19–26.
- [7] Li SB, Liu L, Zhuang XH, Yu Y, Liu XG, *et al.* MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2013, 153(3): 562–574.
- [8] Qin JP, Tang ZH, Ma XX, Meng YJ. Investigating the regulatory roles of the microRNAs and the Argonaute 1-enriched small RNAs in plant metabolism[J]. *Gene*, 2017, 628: 180–189.
- [9] Zhang SX, Shi YY, Shan CM, Zhao LQ, Ma KL, *et al.* Analysis of the transcriptome of *Polygonatum odoratum* (Mill.) druce uncovers putative genes involved in isoflavonoid biosynthesis[J]. *J Plant Biol*, 2020, 63(10): 217–228.
- [10] 单春苗, 王晨凯, 施圆圆, 张声祥, 赵历强, 等. 多花黄精甾体皂苷生物合成途径分析及关键酶基因研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2847–2857.
Shan CM, Wang CK, Shi YY, Zhang SX, Zhao LQ, *et al.* Identification of key enzyme genes involved in biosynthesis of steroidal saponins and analysis of biosynthesis pathway in *Polygonatum cyrtoneuma*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(12): 2847–2857.
- [11] 赵历强, 单春苗, 张声祥, 施圆圆, 马克龙, 等. 基于转录组测序的细风轮花青素合成途径及关键酶基因分析[J]. 植物研究, 2020, 40(6): 886–896.
Zhao LQ, Shan CM, Zhang SX, Shi YY, Ma KL, *et al.* Identification of key enzyme genes involved in anthocyanin synthesis pathway in *Clinopodium gracile* by transcriptome analysis[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2020, 40(6): 886–896.
- [12] Fan RY, Li YJ, Li CF, Zhang YS. Differential microRNA analysis of glandular trichomes and young leaves in *Xanthium strumarium* L. reveals their putative roles in regulating terpenoid biosynthesis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139002.
- [13] 韦荣昌. 三七皂苷生物合成途径关键酶基因和 miRNA 的挖掘与分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014: 96–134.
- [14] Wong MM, Cannon CH, Wickneswari R. Identification of lignin genes and regulatory sequences involved in secondary cell wall formation in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* via de novo transcriptome sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 342–354.
- [15] Shi YY, Zhang SX, Peng DY, Wang CK, Huang LQ. Transcriptome analysis of *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and identification of genes involved in triterpenoid saponin biosynthesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2643–2659.
- [16] Zhao SR, Ye Z, Stanton R. Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols[J]. *RNA*, 2020, 26(8): 903–909.
- [17] Tang C, Xie YM, Guo M. AASRA: An anchor alignment-based small RNA annotation pipeline[J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(1): 267–277.
- [18] Evers M, Huttner M, Dueck A, Meister G, Engelmann JC. miRA: adaptable novel miRNA identification in plants using small RNA sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16(1): 370–379.
- [19] Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(1): 37–52.
- [20] Midway S, Robertson M, Flinn S, Kaller M. Comparing

- multiple comparisons; practical guidance for choosing the best multiple comparisons test [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e10387.
- [21] Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency [J]. *Ann Stat*, 2001, 29(4): 1165–1188.
- [22] Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement ward's criterion [J]. *J Classif*, 2014, 31: 274–295.
- [23] Wu HJ, Ma YK, Chen T, Wang M, Wang XJ. PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012(W1): 22–28.
- [24] Fahlgrén N. miRNA target prediction in plants [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2010: 51–57.
- [25] Liu J, Liu XN, Zhang SJ, Liang SS, Luan WJ, Ma X. TarDB: an online database for plant miRNA targets and miRNA-triggered phased siRNAs [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 348–359.
- [26] Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(6): 276–277.
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [28] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [29] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: W320–W324.
- [30] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W296–W303.
- [31] Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10480.
- [32] Cabrera AC, Gil-Redondo R, Perona A, Gago F, Morreale A. VSDMIP 1.5: an automated structure- and ligand-based virtual screening platform with a PyMOL graphical user interface [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2011, 25(9): 813–824.
- [33] Oliveira SH, Ferraz FA, Honorato RV, Xavier-Neto J, So-breira TJ, de Oliveira PS. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 1–8.
- [34] 于小凤. 经霜对桑叶黄酮类成分积累影响的分子机制研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2018: 10–12.
- [35] Lavhale SG, Kalunke RM, Giri AP. Structural, functional and evolutionary diversity of 4-coumarate-CoA ligase in plants [J]. *Planta*, 2018, 248(5): 1063–1078.
- [36] 胥丽霞, 孙文基. 断血流的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 126–128.
- [37] 陈艳琳. 长白山人参 microRNA 鉴定及靶基因分析研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017: 6–18.
- [38] 王琪月, 孟淑君, 张柯, 张战辉, 汤继华, 等. 玉米雌穗发育杂种优势相关 miRNA 的研究 [J]. 作物学报, 2018, 44(6): 796–813.
- Wang QY, Meng SJ, Zhang K, Zhang ZH, Tang JH, et al. Investigation of maize miRNA involved in developing-ear heterosis [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(6): 796–813.
- [39] 孙平. 茶叶儿茶素合成相关 miRNA 及靶基因的验证和表达分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017: 40–52.
- [40] Zhang SF, Yan SS, Zhao JL, Xiong HH, An PQ, et al. Identification of miRNAs and their target genes in *Larix olgensis* and verified of differential expression miRNAs [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 247–266.
- [41] 毛家旺, 杨艳华, 陈克平, 谭小力. 植物激素与 microRNA 调控种子大小和发育的分子机制研究进展 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 274–292.
- Mao JW, Yang YH, Chen KP, Tan XL. Research progress in molecular mechanisms of plant hormone and microRNA regulating seed size and development [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(2): 274–292.
- [42] Yin YC, Zhang XD, Gao ZQ, Hu T, Liu Y. The research progress of chalcone isomerase (CHI) in plants [J]. *Mol Biotechnol*, 2019, 61(1): 32–52.
- [43] Goetz M, Smith AV, Johnson SD, Koltunow AM. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 1873–1886.
- [44] 陈媿颖, 刘娟, 袁媛, 周骏辉, 黄璐琦. 黄芩 ARF 基因家族生物信息学及表达分析 [J]. 药学学报, 2017, 52(11): 1770–1776.
- Chen TY, Liu J, Yuan Y, Zhou JH, Huang LQ. Bioinformatics analysis and expressed level of Auxin response factor genes in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(11): 1770–1776.
- [45] 鲍茂林. 拟南芥 MIR396 家族对靶基因的调控及对根发育的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 4–6.
- [46] 叶超楠, 沈栢阳, 方春, 曹跃芬, 於金生. 热胁迫下水稻 miR396 家族及靶基因 OsGRFs 的表达研究 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 393–400.
- Ye CN, Shen LY, Fang C, Cao YF, Yu JS. Expression

- analysis of rice (*Oryza sativa*) *miR396* family and target gene *OsGRFs* under heat stress [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(3): 393–400.
- [47] 沈朝斌, 蔡红, 郁兰. 植物药 miRNA396 家族的应用[P]. 中国专利: 105903035. 2015–07–09.
- [48] Gupta OP, Dahuja A, Sachdev A, Kumari S, Jain PK, *et al.* Conserved miRNAs modulate the expression of potential transcription factors of isoflavonoid biosynthetic pathway in soybean seeds [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(4): 3713–3730.
- [49] Liu H, Jia SH, Shen DF, Liu J, Li J, *et al.* Four AUXIN RESPONSE FACTOR genes downregulated by *microRNA167* are associated with growth and development in *Oryza sativa* [J]. *Funct Plant Biol*, 2012; 39(9): 736–744.
- [50] Chandran V, Wang H, Gao F, Cao XL, Chen YP, *et al.* *miR396-OsGRFs* module balances growth and rice blast disease-resistance [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 1999(9): 1–16.
- [51] 黄满芬. 桑树 C4H、4CL 及 CHS 基因克隆及其在不同桑种质间的表达差异 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2014: 41–62.
- [52] 杨晓云, 杨智敏, 罗小娇, 孔德媛, 袁金娥, 等. 青稞 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 4CL 的克隆及表达分析 [J]. 麦类作物学报, 2014, 34(12): 1603–1610.
- Yang XY, Yang ZM, Luo XJ, Kong DY, Yuan JE, *et al.* Cloning and expression analysis of 4-Ceoumarate: CoA ligase gene 4CL in hullless barley [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2014, 34(12): 1603–1610.
- [53] Sun HY, Li Y, Feng SQ, Zou WH, Guo K, *et al.* Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(3): 1151–1156.

(责任编辑: 周 媛)