

• 药材与资源 •

茅苍术 miRNA 鉴定及其调控萜类合成分析

邓娟¹, 张静怡¹, 李谦¹, 黄晓¹, 陈庆梅², 姚林英³, 徐建中³, 余坤^{1*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430070

3. 湖北卫尔康现代中药有限公司, 湖北 黄冈 438021

摘要: **目的** 基于对茅苍术 *Atractylodes lancea* 生长发育的分子机制研究中发现茅苍术叶和根茎的初生代谢和次生代谢差异主要是基因的差异表达引起的, 探索作为基因表达的调节因子 miRNA 在这一过程中的调控机制, 为从 miRNA-mRNA 角度研究茅苍术生长发育代谢奠定基础。**方法** 采用 small RNA 测序技术对茅苍术根茎和叶分别进行测序及分析, 结合 mRNA 数据库用生物信息学的方法分析其组学特征, 进一步挖掘调控萜类合成酶基因的关键 miRNA。**结果** 鉴定出 280 个已知 miRNAs 和 85 个新 miRNAs (novel miRNAs), 归属于 59 个 miRNA 家族; 同时获得 54 个差异表达 miRNAs, 预测到 10 901 个靶基因, KEGG 富集分析差异表达 miRNAs 靶基因功能主要富集在淀粉和蔗糖代谢、萜类骨架生物合成、RNA 降解、苯丙烷代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢等通路。**结论** 分析了茅苍术叶和根茎的 miRNA 及其潜在的靶基因, 关联转录组分析调控茅苍术萜类生物合成和初生代谢相关的 miRNA 及其靶基因, 获得 16 个影响萜类合成 miRNA 和 21 个调控淀粉和蔗糖代谢的 miRNA。为从 miRNA 角度研究茅苍术萜类成分生物合成的分子调控机制提供依据, 也为进一步从基因组水平上利用基因工程手段改良植物提供基础。

关键词: 茅苍术; miRNA; 不同组织部位; 调控; 萜类合成酶

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5938-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.021

Identification of miRNA and analysis regulating terpenoid synthesis in *Atractylodes lancea*DENG Juan¹, ZHANG Jingyi¹, LI Qian¹, HUANG Xiao¹, CHEN Qingmei², YAO Linying³, XU Jianzhong³, YU Kun¹

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhan 430070, China

3. Hubei Weierkang Modern Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Huanggang 438021, China

Abstract: Objective Based on the molecular mechanism study of the growth and development of *Atractylodes lancea*, it was found that the differences in primary and secondary metabolism between the leaves and rhizomes were mainly caused by differential gene expression. This study aims to explore the regulatory mechanism of miRNA in this process and lay the foundation for studying the growth, development, and metabolism of *A. lancea* from the miRNA-mRNA perspective. **Methods** Sequencing and analysis of the rhizome and leaves in *A. lancea* were conducted using small RNA sequencing technology, and combining mRNA databases with bioinformatics methods to analyze their genomic characteristics, further exploring key miRNAs that regulate terpenoid synthase genes. **Results** A total of 280 known miRNAs and 85 novel miRNAs were identified, belonging to 59 miRNA families. At the same time, a total of 54 differentially expressed miRNAs were obtained, and 10 901 target genes were predicted. KEGG enrichment analysis showed that the target gene functions of differentially expressed miRNAs were mainly enriched in pathways such as starch and sucrose metabolism, terpenoid

收稿日期: 2025-03-30

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目 (B2023081)

作者简介: 邓娟, 博士, 实验师, 主要从事中药资源与品质研究。E-mail: http_dengjuan@163.com

*通信作者: 余坤, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源与品质研究。E-mail: yukun_hbctm@163.com

skeleton biosynthesis, RNA degradation, phenylalanine metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism.

Conclusion This study analyzed the miRNAs and potential target genes in the leaves and rhizomes, and explored the miRNAs and target genes that regulate terpenoid synthesis and primary metabolism associated transcriptome database. A total of 16 miRNAs that affect terpenoid synthesis and 21 miRNAs that regulate starch and sucrose metabolism were obtained. This provides a basis for studying the molecular regulatory mechanisms of terpenoid biosynthesis in *A. lancea* from the perspective of miRNA, and also lays the foundation for further utilizing genetic engineering methods at the genome level to improve plants in the future.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; miRNA; different tissue parts; regulation; terpenoid syntheses

菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的根茎具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效^[1], 主产于江苏、湖北、安徽、河南等省。挥发油中的萜类化合物是茅苍术根茎的主要有效成分之一^[2], 如 β -桉叶醇 (β -eudesmol)、茅术醇 (hinesol) 和苍术酮 (atractylone) 等。叶和根茎是植物 2 个重要的营养器官, 叶的主要作用是捕获光能、进行光合作用和积累同化物, 而根茎主要吸收营养元素、储存能量帮助植物越冬和再生^[3]。本课题组前期利用转录组学和代谢组学结合的方法, 对茅苍术生长发育的分子机制进行研究, 发现茅苍术叶和根茎的初生代谢和次生代谢差异主要是基因的差异表达引起的^[4], 但对于基因差异表达的调节机制仍不清楚。

miRNA 是一类广泛存在于基因组内长 20~25 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA, 通过和靶基因 mRNA 上的特定序列结合, 诱导靶基因 mRNA 被剪切或抑制其翻译, 从而在转录后水平调控植物的生长发育、次生代谢产物合成和逆境响应^[5-6]。目前已有研究报道 miRNA 可以影响植物的生长发育, 如台湾甜树胶中, 不同季节 miR164 可靶向调控 *NAC* 基因的表达从而影响叶片的衰老^[7]; 小麦经低温胁迫后 *tac-miR167d* 相对表达量下调, 而其靶基因 *ARF12* 则表达量上升, 以提高小麦的耐寒性^[8]。miRNA 也可以影响植物的次生代谢, 如高表达 miR160 可显著损害黄花蒿叶片上腺毛的形成并抑制青蒿素的生物合成^[9]; miR854e 可以靶向 *FPS* 基因, 调控高丽参次生代谢产物人参皂苷的生物合成^[10]。因此, miRNA 作为影响植物生长发育和次生代谢产物合成途径中的重要调节因子, 确定其调控功能对于探索植物生长发育代谢具有重要意义。

本研究通过高通量测序技术对湖北大别山地区野生茅苍术 miRNA 进行鉴定与分析, 通过对根茎和

叶差异表达的 miRNA 靶基因预测分析, 探索 miRNA 对茅苍术萜类化合物和初生代谢产物合成的潜在调控机制, 以期从 miRNA 角度研究调控茅苍术生长发育和萜类化合物合成的研究奠定基础。

1 材料

用于 small RNA-seq 的野生茅苍术植株来自湖北大别山区的英山县草盘地镇黄沙河村 (30°44'N, 115°40'E), 经湖北中医药大学刘合钢教授鉴定为菊科植物茅苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC.。实验材料在野外采集时分离出叶和根茎, 迅速用清水清洗表面泥土, 然后放入液氮中保存, 直至 RNA 提取。用于 small RNA 测序的材料为 3 个平行样 (每个平行样为 3 株不同植株的混样)。

2 方法

2.1 miRNA 文库的构建与测序

Trizol 法提取总 RNA, 并对总 RNA 样品质量进行检测。RNA 检测合格后, 使用 Small RNA Sample Pre Kit 试剂盒 (Illumina) 富集 miRNA、siRNA 及 piRNA, 并进行文库构建。具体步骤: 将 NEB 3' 接头与 miRNA、siRNA 及 piRNA 的 3' 端特异性的结合, 随后 RT 引物与多余的 3' 接头结合, 进行末端封闭, 并将该单链 DNA 接头片段合成为双链 DNA 片段; 用 NEB 5' 接头与 miRNA、siRNA 及 piRNA 的 5' 端特异性的结合, 随后用 RNA 逆转录酶反转录合成第一链 cDNA; 采用 PCR 的方法将 Illumina 的测序接头连接在 cDNA 上, 并进行双链 cDNA 合成; PCR 产物通过 8% 聚丙烯酰胺凝胶纯化 (回收 140~160 bp 的目的条带) 后得到 cDNA 文库。文库构建完成后, 使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测, 库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。

2.2 测序数据的生物信息学分析

鉴于茅苍术尚无公布的基因组数据, 采用北京

诺禾致源生物科技有限公司的植物 small RNA 无参分析流程进行生物信息学分析。与此同时,以野生茅苍术的转录组数据^[4]为参考文库,用于 miRNA 的鉴定和 miRNA-mRNA 关联分析。

miRNA 生物信息分析的主要步骤如下。(1)质控:去除低质量 reads;去除 N(N 表示无法确定碱基信息)的比例大于 10%的 reads;去除有 5'接头污染的 reads;去除没有 3'接头序列和插入片段的 reads;trim 掉 3'接头序列;去除 polyA/T/G/C 的 reads。(2)与参考转录组序列比对:使用 bowtie 软件进行以获得 mapped sRNA 用于后续数据分析。(3)已知 miRNA 分析:使用 miRBase21.0 将比对到参考序列上的 reads 在软件指定范围序列上进行比对,得到潜在的 sRNA 及其二级结构,各样本中 miRNA 的序列、长度、出现的次数等信息。(4)新 miRNA 分析:利用 miRNA 前体发夹结构的特点可以对新 miRNAs 进行预测。使用的软件是 miREvo 和 mirdeep2,通过截取一定长度 sRNA 比对上的参考序列,探寻其二级结构及 Dicer 酶切位点信息,最小自由能等特征,预测样品中新 miRNA。(5)Small RNA 注释:对所有 small RNA 注释信息,按照已知 miRNA>rRNA>tRNA>snRNA>snoRNA>repeat>gene>NAT-siRNA>gene>新 miRNA>ta-siRNA 的排序对获得注释的 small RNA 进行唯一注释信息确认。(6)miRNA 家族分析:为探索其所属的 miRNA 家族在其他物种中的存在情况,使用 miFam.dat 数据库和 Rfam 软件分别对已知 miRNA 和新 miRNA 进行家族分析。

2.3 差异 miRNA 的筛选

MiRNA 差异表达的输入数据为 miRNA 表达水平分析中得到的 readcount 数据。采用基于负二项分布的 DESeq2 进行分析,设置阈值 $P_{adj} < 0.05$ 且

$|\log_2(\text{fold change})| > 1$,最终得到茅苍术根茎和叶之间的差异 miRNA。

2.4 差异表达 miRNA 的靶基因表达分析

通过 TPM(transcripts per million)评估已知和新 miRNA 表达量,筛选出差异表达的 miRNA。基于对应的转录组数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因,分别进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。最后筛选出萜类合成或植物初生代谢相关差异表达 miRNA 和靶基因,根据 miRNA-mRNA 关联分析,进一步分析影响茅苍术萜类合成或初生代谢相关的差异表达 miRNA 和差异表达靶基因,从而推断相关 miRNA 的功能。

3 结果与分析

3.1 MiRNA 测序数据分析

本次高通量测序,分别对野生茅苍术叶和根茎 2 组样品的 6 个样本进行测序分析,建立 miRNA 文库。对于高通量测序得到的原始数据(raw reads)经过一系列的处理后得到有效数据(clean reads)。之后对各样品的 clean reads 中筛选长度区间为 18~30 nt 的 sRNA,获得总 sRNA。Small RNA 数据分析结果显示,茅苍术叶的总 sRNA 为 36 388 415、茅苍术根茎的总 sRNA 为 41 121 898,具体统计结果见表 1。同时将各组织的总 sRNA 的长度分布进行统计,结果显示野生茅苍术叶 sRNA 的长度分布最多的为 21 nt,其次为 24 nt 和 22 nt;根茎 sRNA 的长度分布最多的为 24 nt,其次为 21 nt 和 22 nt(图 1)。该结果与其他植物,如紫花苜蓿和水稻等^[11-12]的研究结果一致。植物中 21、22、24 nt 3 种小 RNA 的占比相对较高是一种普遍存在的现象,它们是由植物细胞内的 DICER-LIKE 核酸内切酶作用产生的。

表 1 茅苍术 small RNA 测序数据

Table 1 Small RNA sequencing data in *A. lancea*

样本名称	原始读数	N 的比例大于 10% (占比/%)	低质量 (占比/%)	5'接头污染 (占比/%)	没有 3'接头序列和 插入片段(占比/%)	含有 ployA/T/ G/C(占比/%)	有效数据 (占比/%)	总 sRNA
叶 1	17 478 230	0 (0.00)	28 263 (0.16)	28 406 (0.16)	166 088 (0.95)	15 636 (0.09)	17 239 837 (98.64)	12 314 447
叶 2	13 961 252	127 (0.00)	22 160 (0.16)	28 678 (0.21)	329 560 (2.36)	23 021 (0.16)	13 557 706 (97.11)	10 028 310
叶 3	17 343 064	0 (0.00)	29 748 (0.17)	77 491 (0.45)	297 622 (1.72)	44 567 (0.26)	16 893 636 (97.41)	14 045 658
根茎 1	15 494 707	0 (0.00)	34 770 (0.22)	27 845 (0.18)	232 751 (1.50)	14 473 (0.09)	15 184 868 (98.00)	9 810 860
根茎 2	20 561 947	0 (0.00)	37 869 (0.18)	31 389 (0.15)	821 234 (3.99)	95 045 (0.46)	19 576 410 (95.21)	17 238 404
根茎 3	16 193 421	0 (0.00)	36 692 (0.23)	22 443 (0.14)	316 913 (1.96)	39 542 (0.24)	15 777 831 (97.43)	14 072 634

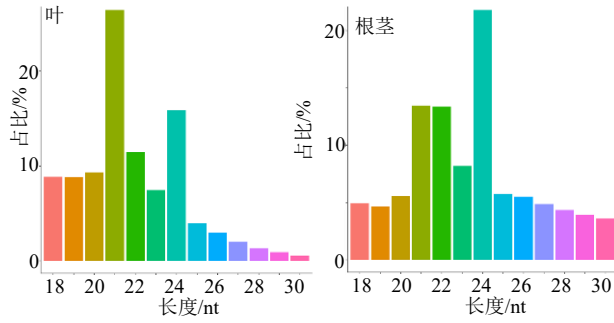


图 1 sRNA 的长度分布

Fig. 1 Length distribution of sRNA

表 2 茅苍术 small RNA 参考转录组的信息统计

Table 2 Small RNA sequence statistics of transcriptome alignment in *A. lancea*

样本部位	总 sRNA	Mapped sRNA (占比/%)	“+” Mapped sRNA (占比/%)	“-” Mapped sRNA (占比/%)
叶	36 388 415	26 555 617 (72.98)	14 805 809 (55.75)	11 749 808 (44.25)
根茎	41 121 898	23 508 836 (57.17)	14 578 571 (62.01)	8 930 265 (37.99)

表 3 茅苍术比对上的 sRNA 的注释分类统计

Table 3 Annotation and classification statistics of sRNA in comparison of *A. lancea*

类型	叶部位 (占比/%)	根茎部位 (占比/%)
总数	26 555 617	23 508 836
已知 miRNA	625 059 (2.35)	20 7750 (0.88)
rRNA	15 782 480 (59.43)	14 063 543 (59.82)
tRNA	216 203 (0.81)	78 567 (0.33)
snRNA	11 061 (0.04)	8 564 (0.04)
snoRNA	25 923 (0.10)	23 976 (0.10)
新 miRNA	109 212 (0.41)	68 774 (0.29)
TAS	582 374 (2.19)	339 282 (1.44)
其他	9 203 305 (34.66)	8 718 380 (37.09)

用 bowtie 软件将长度筛选后的总 sRNA 定位到参考序列 (对应的转录组数据库) 上, 分析 RNA 在参考序列上的分布情况, 获得 mapped sRNA: 茅苍术叶为 26 555 617、茅苍术根茎为 23 508 836 (表 2)。由于存在一个 sRNA 同时比对上几种不同的注释信息的情况, 为了使每个 unique small sRNA 有唯一的注释, 按照已知 miRNA > rRNA > tRNA > snRNA > snoRNA > repeat > 新 miRNA > ta-siRNA 检测的优先级顺序将 small RNA 分类, 分类注释结果显示 rRNA 占比最大 (表 3)。

3.2 已知 miRNA 和新 miRNA 的鉴定

鉴于现有 miRBase 数据库还未收录茅苍术 miRNA, 故本研究将测序获得 miRNA 序列与 miRNA 数据库 miRBase 21.0 中植物的成熟序列及前体序列进行比对, 以此鉴定出已知的 miRNA。基于序列同源性, 本研究共鉴定出 280 个已知 miRNAs 和 85 个新 miRNAs。其中获得的已知 miRNAs 前体序列和 7 个新 miRNAs 前体 (novel_56、novel_37、novel_89、novel_12、novel_30、novel_8、novel_29) 分别属于 59 个 miRNA 家族 (图 2), 最大的 miRNA 家族是 MIR159, 有 51 个成员; 其次是 MIR156, 有 50 个成员。根据测序结果显示各个 miRNA 家族之间的表达量有很大变化, 而且属于同一个家族不同 miRNA 成员的相对表达量也各不相同。

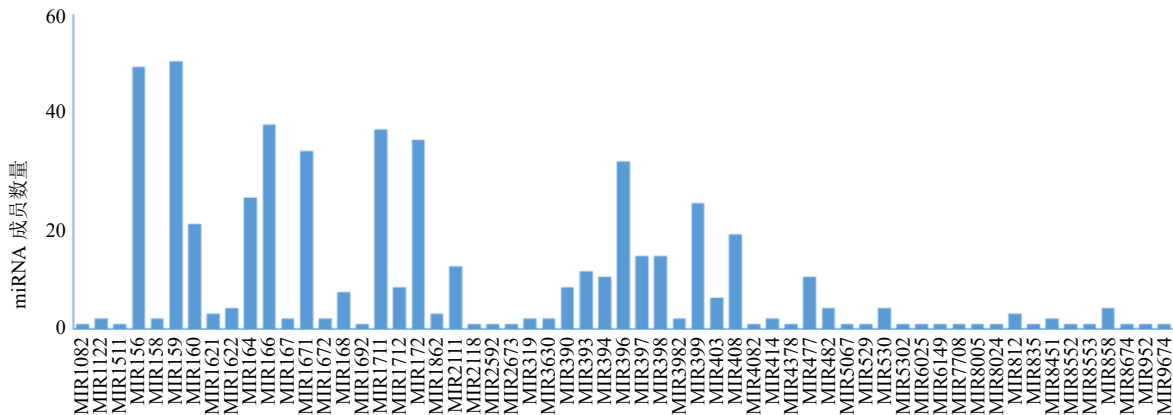


图 2 miRNA 家族的数量

Fig. 2 Quantity distribution of miRNA family

3.3 MiRNA 的差异表达

对 miRNA 表达量进行比较, 根据 $P < 0.05$ 且 $\log_2|\text{FoldChange}| > 1$ 为筛选条件鉴别差异表达 miRNA, 结果如图 3 火山图所示。茅苍术根茎和叶共有差异表达 miRNAs 54 个, 其中有 33 个上调和 21 个下调 miRNA。54 个差异表达 miRNAs 包含已知 miRNAs 41 个和新 miRNAs 13 个, 差异表达的 miRNA 在不同样本中表达量如图 4 所示。

3.4 差异表达 miRNA 的靶基因分析

通过 TargetFinder 预测软件对 54 个差异表达 miRNAs 的靶基因进行预测。由于 1 个 miRNA 可对应 1 个或多个潜在靶基因, 同时 miRNA 家族中的不同成员可能靶向相同或不同的基因, 这将导致预测得到的靶基因能编码不同的蛋白, 本研究共预

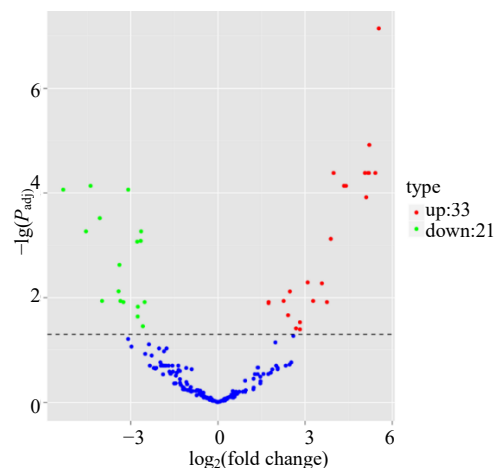


图 3 差异表达 miRNAs

Fig. 3 Volcanic map of differentially expressed miRNAs

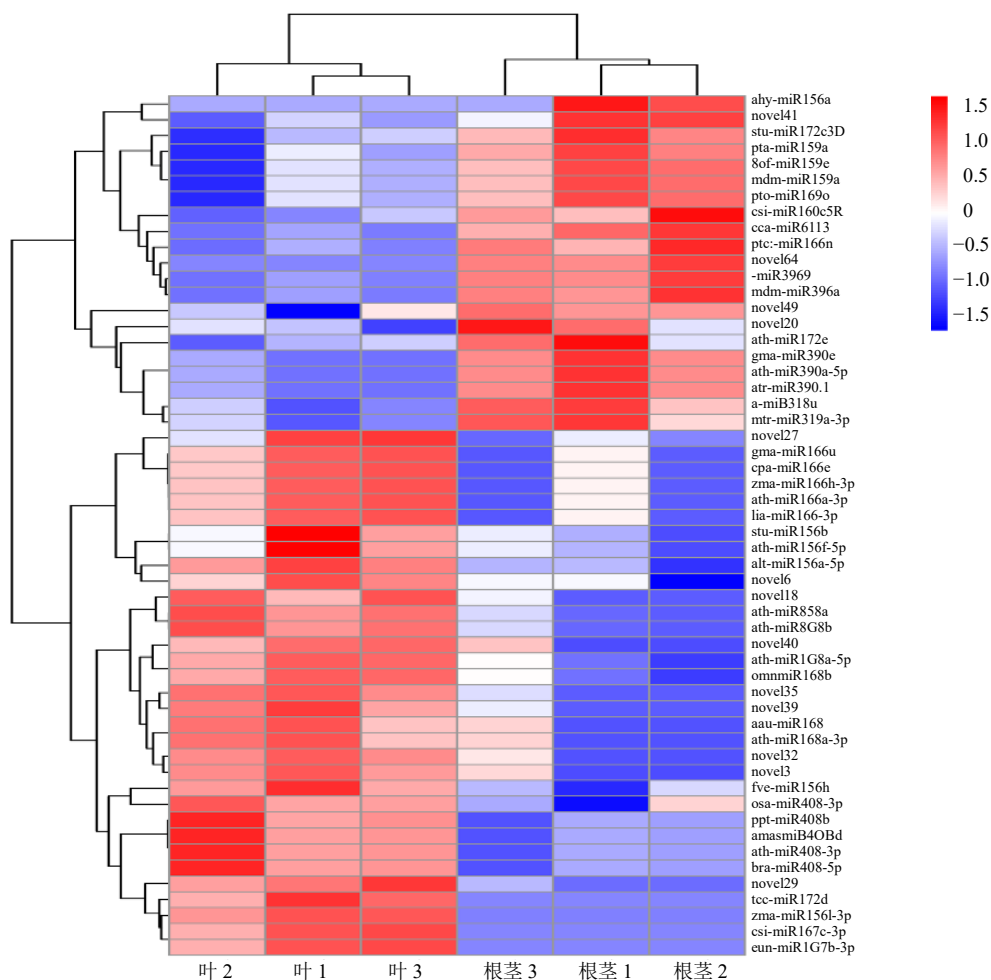


图 4 差异表达 miRNA 表达量情况

Fig. 4 Distribution of differentially expressed miRNA expression levels

测到候选靶基因 10 901 个。利用 Blast2GO 对这些候选靶基因进行 GO 功能分析, 结果发现靶基因的功能主要包括 11 个生物学过程、7 个分子功能和 12

个细胞组分 (图 5)。在生物学过程项中主要涉及到调控作用, 例如对初生代谢过程的调节 (GO: 0080090) 和大分子生物合成过程的调控 (GO:

0010557); 在分子功能项中主要涉及到结合功能项 (GO: 0005488); 在细胞成分项中主要涉及细胞 (GO: 0005623) 和细胞器 (GO: 0044464) 项等。同时, KEGG 通路分析潜在靶基因前 20 个通路主要包括淀粉和蔗糖代谢、萜类骨架生物合成、RNA 降解、苯丙烷代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢等 (图 6)。

3.5 茅苍术萜类合成和初生代谢相关的 miRNA 及其靶基因分析

基于差异表达 miRNA 靶基因分析的结果, 从 KEGG 中挑选涉及到茅苍术次生代谢产物—萜类化

合物合成的相关的通路, 分别为二萜类合成途径 (ko00904), 萜类骨架合成途径 (ko00900), 单萜类合成途径 (ko00902) 和倍半萜和三萜类合成途径 (ko00909), 其中共涉及到靶基因 34 个, 结合转录组的 mRNA 数据库, 属于根茎和叶差异表达的靶基因有 15 个。同时将差异表达靶基因对应的 16 差异表达 miRNA 家族进行分析, 以获得调控茅苍术萜类生物合成的 miRNA, 具体见表 4。

同时基于靶基因富集分析筛选与茅苍术初生代谢相关的相关 KEGG 通路——淀粉和蔗糖代谢 (ko00500), 其中涉及的靶基因共 69 个, 结合转录组的 mRNA 数据库, 属于根茎和叶差异表达的靶基因有 26 个。然后将差异表达靶基因对应的 21 差异表达 miRNA 家族进行分析, 具体见表 4。此结果为后续研究 miRNA 调控茅苍术初生代谢研究提供实验依据。

4 讨论

MiRNA 是基因表达转录后水平的重要调节因子, 在植物生长、发育和代谢等生物学过程中发挥重要作用。通过 small RNA 测序方法在东乡水稻中鉴定到了 215 个家族的 505 个已知 miRNAs^[12]; Li 等^[11]在苜蓿中发现了 348 个 known miRNAs 和 281 个 novel miRNAs。本研究以大别山区茅苍术为研究材料进行 small RNA 测序, 共鉴定出 280 个已知 miRNAs 和 85 个新 miRNAs, 叶 sRNA 长度分布最多的为 21 nt, 而根茎最多的则为 24 nt, 这种 sRNA 的不同长度分布表明了 sRNA 在茅苍术植物不同组织部位的不同特征。

在茅苍术 miRNA 数据库中, 使用 miREvo44 和 mirdeep2 软件共鉴定到 85 种 novel miRNA, 但有 7 个新 miRNAs (novel_56、novel_37、novel_30、novel_8、novel_29、novel_89 和 novel_12) 可匹配到已知的 miRNA 家族。由于可形成良好的二级结构, novel_56 和 novel_37 的 pre-miRNA 序列属于 MIR168 家族, novel_30 和 novel_8 属于 MIR396 家族, novel_29、novel_89 和 novel_12 的 pri-miRNA 序列分别属于 MIR164、MIR159 和 MIR162 家族。为了解归属于 5 个已知 miRNA 家族的新 miRNAs 的功能, 对其预测的 miRNA 家族进行了分析。有研究表明 MIR168 和 MIR396 家族参与了拟南芥的多种应激反应, 包括低温、干旱和高盐^[13-14]; MIR164 家族参与调控诱导拟南芥叶片中衰老细胞的死亡^[15]; MIR159 家族和 MIR162 家族分别参与植物的花粉

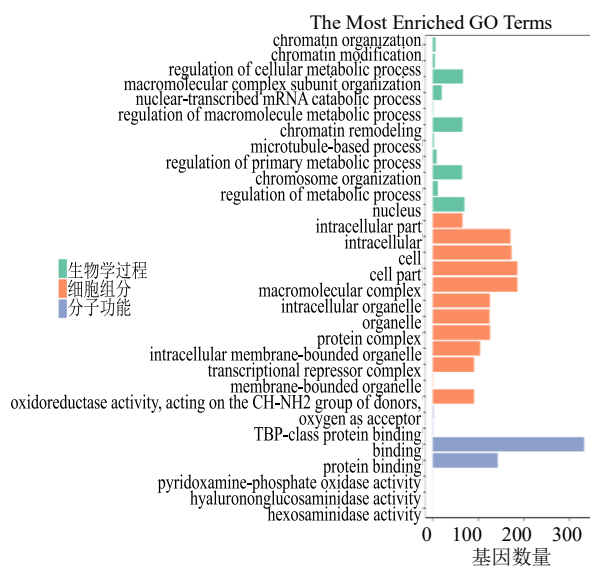


图 5 茅苍术差异表达 miRNAs 靶基因的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of differential expression of miRNAs target genes in *A. lancea*

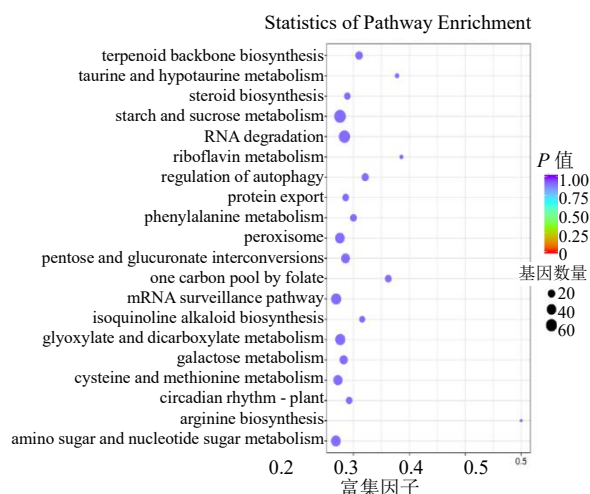


图 6 茅苍术差异表达 miRNAs 靶基因的 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis of differential expression of miRNAs target genes in *A. lancea*

表 4 与萜类生物合成及初生代谢相关的 miRNA

Table 4 miRNA related to terpenoid biosynthesis and primary metabolism formation

类别	pathway ID	数量	靶基因 ID 号	差异表达靶基因	差异表达 miRNA	对应的 miRNA 家族
二萜	ko00904	4	Cluster-16884.42773 、 Cluster-16884.37438 、 Cluster-16884.30487、Cluster-14828.0	—	—	—
萜类骨架	ko00900	21	Cluster-16884.10161 、 Cluster-16884.14106 、 Cluster-Cluster-16884.19922 、 Cluster-16884.40935 、 Cluster-16884.42543 、 Cluster-16884.14106 、 Cluster-16884.37403 、 Cluster-16884.59603 、 Cluster-16884.35830 、 Cluster-16884.47800 、 Cluster-16884.40219 、 Cluster-16884.10161 、 Cluster-16884.37751 、 Cluster-16884.33335 、 Cluster-16884.43071 、 Cluster-16884.13135 、 Cluster-16884.49077 、 Cluster-16884.47800 、 Cluster-16884.39466 、 Cluster-16884.35830 、 Cluster-16884.40219 、 Cluster-16884.38324 、 Cluster-16884.40223 、 Cluster-16884.38324 、 Cluster-16884.57078 、 Cluster-16884.43384 、 Cluster-16884.19922 、 Cluster-16884.57078 、 Cluster-16884.39910	Cluster-ath-miR156a-5p 、 ath-MIR156 、 MIR858 、 Cluster-miR858a 、 ath-MIR164 、 Cluster-miR858b 、 novel_29 、 MIR396 、 Cluster-ppe-miR396a 、 stu-MIR172、 MIR166 、 Cluster-miR156f-5p 、 fve-Cluster-miR156h 、 stu-Cluster-miR172c-3p 、 cpa-Cluster-miR166e 、 gma-Cluster-miR166u 、 novel_6 、 novel_20、 Cluster-16884.40223、 Cluster-16884.43384		
单萜	ko00902	4	Cluster-16884.38908 、 Cluster-16884.45393 、 Cluster-Cluster-16884.45393 、 Cluster-Cluster-16884.28446	16884.28446	Cluster-ath-miR156a-5p 、 gma-MIR156、 MIR408 、 miR408d 、 ppt-miR408b 、 stu-miR156f-5p、	
倍半萜和三萜	ko00909	5	Cluster-16884.35814 、 Cluster-28180.0 、 Cluster-Cluster-16884.35814 、 Cluster-Cluster-16884.35996	16884.3403、	Cluster-ahy-miR156a 、 cpa-MIR156、 MIR166 、 Cluster-miR166e、 novel_20、	
淀粉和蔗糖代谢	ko00500	69	Cluster-27438.0 、 Cluster-16884.25849 、 Cluster-Cluster-16884.14591 、 Cluster-16884.38619 、 Cluster-16884.34843 、 Cluster-16884.65458 、 Cluster-16884.76900 、 Cluster-16884.45790 、 Cluster-28304.0 、 Cluster-16884.61305 、 Cluster-16884.45250 、 Cluster-16884.44618 、 Cluster-16884.23843 、 Cluster-16884.44895 、 Cluster-16884.8323 、 Cluster-16884.29921 、 Cluster-16884.36998 、 Cluster-16884.52812 、 Cluster-16884.25849 、 Cluster-16884.39721 、 Cluster-16884.43330 、 Cluster-16884.48294 、 Cluster-16884.14591 、 Cluster-16884.51342 、 Cluster-16884.68793 、 Cluster-16884.43394 、 Cluster-16884.14493 、 Cluster-16884.43394 、 Cluster-16884.36302 、 Cluster-16884.35861 、 Cluster-16884.76900 、 Cluster-16884.37281 、 Cluster-16884.58939 、 Cluster-16884.35861 、 Cluster-16884.28148 、 Cluster-16884.37645 、 Cluster-16884.5667、Cluster-16884.1075、 Cluster-16884.58993 、 Cluster-16884.46931 、 Cluster-Cluster-16884.37281 、 Cluster-Cluster-16884.37281 、 Cluster-16884.13890 、 Cluster-16884.45250 、 Cluster-16884.43783 、 Cluster-16884.207、Cluster-16884.37627、 Cluster-16884.36752 、 Cluster-Cluster-16884.34251 、 Cluster-16884.40249 、 Cluster-16884.43330 、 Cluster-Cluster-16884.42595 、 Cluster-16884.45238 、 Cluster-16884.42595 、 Cluster-Cluster-16884.64608 、 Cluster-16884.21577 、 Cluster-Cluster-16884.58939 、 Cluster-28304.0 、 Cluster-16884.23843 、 Cluster-16884.38086 、 Cluster-7989.1 、 Cluster-Cluster-16884.1075 、 Cluster-16884.48294 、 Cluster-16884.51342 、 Cluster-Cluster-16884.13890 、 Cluster-16884.36752 、 Cluster-10786.0 、 Cluster-16884.40249、 Cluster-16884.45790 、 Cluster-16884.22445 、 Cluster-16884.14355 、 Cluster-29725.0 、 Cluster-16884.5667 、 Cluster-16884.68793 、 Cluster-16884.57149 、 Cluster-16884.24250 、 Cluster-16884.65458 、 Cluster-16884.78888 、 Cluster-16884.45114 、 Cluster-16884.42190 、 Cluster-16884.29921 、 Cluster-26555.0 、 Cluster-16884.80795 、 Cluster-10925.0 、 Cluster-16884.46098 、 Cluster-16884.42162、Cluster-16884.44979	Cluster-ath-miR156a-5p 、 bra-MIR156 、 MIR408 、 Cluster-miR408-5p 、 csi-MIR167 、 Cluster-miR167c-3p 、 eun-MIR319 、 Cluster-miR167b-3p 、 mtr-MIR172 、 Cluster-miR319a-3p 、 MIR159 、 Cluster-novel_32 、 ath-MIR168 、 Cluster-miR172c 、 cca-MIR166、 MIR160 、 Cluster-miR156b 、 stu-Cluster-miR156f-5p 、 fve-Cluster-miR156h 、 pta-Cluster-miR159a 、 novel_27、 Cluster-ahy-miR156a 、 gma-Cluster-miR168b 、 stu-Cluster-miR172c-3p 、 mdm-Cluster-miR159a 、 pta-Cluster-miR159c 、 sof-Cluster-miR159c 、 gma-Cluster-miR166u 、 csi-miR160c-5p、 novel_20		

发育、抗盐和抗旱^[16-17]。因此, novel_56、novel_37、novel_30、novel_8、novel_89 和 novel_12 可能属于应激反应性 miRNA, novel_29 可以作为植物衰老的调节器。

前期研究表明, 茅苍术叶中高表达基因集中在光合作用和淀粉和蔗糖代谢, 根茎中高表达基因集中在植物激素和次生代谢^[4]。本实验通过 small RNA 测序发现茅苍术根茎和叶差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 富集分析中主要集中在淀粉和蔗糖代谢、萜类骨架生物合成、氨基糖和核苷酸糖的代谢等, 这与转录组分析茅苍术不同组织部位差异 mRNA 结

果一致。深入分析影响茅苍术初生代谢产物形成(淀粉和蔗糖)的差异 miRNA, 主要来自 9 个 miRNA 家族的 21 个 miRNA。推测茅苍术根茎和叶初生代谢产物的形成, 可能是茅苍术通过调节自身某些 miRNA 的表达, 作用于对应靶基因而引起的。

miRNA 主要通过调节萜类化合物合成途径中酶基因的表达来影响萜类化合物的合成^[18-19]。薄荷属植物中, miR156 和 miR414 分别通过靶向 *DXS* 和 *TPS21* 基因参与萜类化合物的生物合成^[20-21]。在本研究中存在 16 个差异表达的 miRNA 影响萜类化合物的生物合成(表 4), 这 16 个差异表达的 miRNA

分别来自 7 个家族 (MIR156、MIR858、MIR164、MIR396、MIR172、MIR166、MIR408)。目前 miR164 已经在红豆杉中可以靶向紫杉烷 13 α 羟化酶, 从而影响紫杉醇的生物合成^[22]; 同时 miR858 已被证实可以靶向黄花蒿中青蒿素合成的关键酶基因紫穗槐-4,11-二烯合酶和 MYB1, 从而调控青蒿素的合成^[23]。尽管还有 5 种 MIRNA 尚未被报道影响萜类化合物的合成, 但这将为后续从 miRNA 角度研究茅苍术中间萜类成分合成的调控机制提供研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突
参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 168.
- [2] Zhou Y. Comparison of the volatile compounds of crude and processed *Atractylodis Rhizome* analyzed by GC-MS [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2012, 6(28): 45-56.
- [3] Geneve R L, Dutton S, Baloh A G, et al. Rhizome segments form shoots, whereas leaf cuttings form shoots and rhizomes in *Eucodonia 'adele'* treated with benzyladenine [J]. *HortScience*, 58(7): 785-791.
- [4] Huang Q Q, Huang X, Deng J, et al. Differential gene expression between leaf and rhizome in *Atractylodes lancea*: A comparative transcriptome analysis [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 348.
- [5] Guo Z L, Kuang Z, Deng Y, et al. Identification of species-specific microRNAs provides insights into dynamic evolution of microRNAs in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14273.
- [6] Pagano L, Rossi R, Paesano L, et al. miRNA regulation and stress adaptation in plants [J]. *Environ Exp Bot*, 2021, 184: 104369.
- [7] Wen C H, Hong S F, Hu S F, et al. Lfo-miR164b and LfNAC1 as autumn leaf senescence regulators in Formosan sweet gum (*Liquidambar formosana* Hance) [J]. *Plant Sci*, 2020, 291: 110325.
- [8] 宋国琦, 李玮, 张淑娟, 等. tae-miR167d 及靶基因 ARF12 在小麦中的表达模式分析 [J]. *山东农业科学*, 2021, 53(5): 25-31.
- [9] Guo Z Y, Hao K, Lv Z Y, et al. Profiling of phytohormone-specific microRNAs and characterization of the miR160-ARF1 module involved in glandular trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21(3): 591-605.
- [10] Mathiyalagan R, Subramaniyam S, Natarajan S, et al. Insilico profiling of microRNAs in Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(2): 227-247.
- [11] Li Y, Wan L Q, Bi S Y, et al. Identification of drought-responsive microRNAs from roots and leaves of alfalfa by high-throughput sequencing [J]. *Genes*, 2017, 8(4): 119.
- [12] Zhang F T, Luo X D, Zhou Y, et al. Genome-wide identification of conserved microRNA and their response to drought stress in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(4): 711-721.
- [13] Pegler J L, Nguyen D Q, Oultram J M J, et al. Molecular manipulation of the MiR396/GRF expression module alters the salt stress response of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Agronomy*, 2021, 11(9): 1751.
- [14] Lin Y C, Zhang L Y, Zhao Y Y, et al. Comparative analysis and functional identification of temperature-sensitive miRNA in *Arabidopsis* anthers [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 532(1): 1-10.
- [15] Kim H J, Hong S H, Kim Y W, et al. Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(14): 4023-4036.
- [16] Li B D, Tao P, Xu F, et al. Function of soybean miR159 family members in plant responses to low phosphorus, high salinity, and abscisic acid treatment [J]. *Agronomy*, 2023, 13(7): 1798.
- [17] Li X P, Ma X C, Wang H, et al. Osa-miR162a fine-tunes rice resistance to *Magnaporthe oryzae* and Yield [J]. *Rice*, 2020, 13(1): 38.
- [18] Tu Z H, Hao Z Y, Liu Q, et al. Multi-omics analyses reveal microRNAs' role in terpene biosynthesis regulation in slash pine [J]. *Ind Crops Prod*, 2024, 216: 118625.
- [19] Narnoliya L K, Kaushal G, Singh S P. Long noncoding RNAs and miRNAs regulating terpene and tartaric acid biosynthesis in rose-scented *Geranium* [J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(16): 2235-2249.
- [20] Singh N, Srivastava S, Shasany A K, et al. Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha spp* [J]. *Comput Biol Chem*, 2016, 64: 154-162.
- [21] 杨航, 李航, 高崎. microRNA 调控药用植物萜类生物合成研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2023, 25(2): 403-412.
- [22] Sun M S, Jia Y, Chen X Y, et al. Regulatory microRNAs and phasiRNAs of paclitaxel biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1403060.
- [23] Khan S, Ali A, Saifi M, et al. Identification and the potential involvement of miRNAs in the regulation of artemisinin biosynthesis in *A. annua* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13614.

[责任编辑 时圣明]