

# 马蔺根系响应 Cd 胁迫的 miRNA 高通量测序分析

刘凉琴<sup>1</sup>, 宋爱萍<sup>1</sup>, 张永侠<sup>2</sup>, 原海燕<sup>2</sup>, 黄苏珍<sup>2</sup>, 刘兆磊<sup>1,①</sup>, 顾春笋<sup>2,①</sup>

[1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

**摘要:** 为了解 Cd 胁迫下马蔺(*Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz.)根系 miRNA 的表达模式,采用高通量测序法对 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0(CK)和 24 h(Cd)后马蔺根系的 sRNA 文库(分别为 CK 和 Cd 文库)进行分析,筛选出显著差异表达的 miRNA,并对这些 miRNA 的靶基因功能进行预测;在此基础上,采用 qRT-PCR 技术对部分 miRNA 及其靶基因的表达模式进行验证。结果表明:在 CK 和 Cd 文库中,未注释的 sRNA 序列较多,分别占各自 sRNA 特异序列总数的 86.4% 和 80.5%;在已注释的 sRNA 序列中,miRNA 所占比例最低(分别为 0.3% 和 0.5%),而 rRNA 所占比例最高(分别为 9.4% 和 11.8%);2 个文库中的 sRNA 长度主要为 21~24 nt,且均以 21 nt 为最多。从 Cd 胁迫下马蔺根系 sRNA 中共筛选出 32 个显著差异表达的 miRNA,其中 20 个 miRNA 表达量下调(分别属于 miR165、miR166、miR167、miR168、miR390 和 miR396 家族),12 个 miRNA 表达量上调。功能预测结果表明:这些 miRNA 靶基因的功能主要集中在生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面;而从 KEGG 通路富集分析看,富集在核糖体、氨基酸生物合成和碳代谢 3 个通路上的差异表达 miRNA 的靶基因数分别为 122、88 和 82 个。qRT-PCR 验证结果表明:在 CK 和 Cd 文库间,11 个差异表达 miRNA 及 8 个靶基因的相对表达量均有显著差异( $P < 0.05$ );其中,11 个 miRNA 相对表达量的上调和下调趋势与上述筛选结果一致,并且 miRNA 相对表达量上调时,其靶基因的相对表达量下调,反之亦然,说明 Cd 胁迫条件下马蔺根系的 miRNA 负调控其靶基因的表达,并且这些靶基因主要参与编码转录因子、HD-ZIP 蛋白和信号蛋白等过程。

**关键词:** 马蔺; Cd 胁迫; miRNA; 靶基因; 高通量测序; 差异表达

中图分类号: Q946-33; S682.1\*9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)03-0001-11

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.03.01

**High throughput sequencing analysis on miRNA in root of *Iris lactea* var. *chinensis* response to Cd stress** LIU Liangqin<sup>1</sup>, SONG Aiping<sup>1</sup>, ZHANG Yongxia<sup>2</sup>, YUAN Haiyan<sup>2</sup>, HUANG Suzhen<sup>2</sup>, LIU Zhaolei<sup>1,①</sup>, GU Chunsun<sup>2,①</sup> (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(3): 1-11

**Abstract:** In order to understand the expression pattern of miRNA in root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress, sRNA libraries (which is CK and Cd libraries, respectively) from root of *I. lactea* var. *chinensis* after stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 (CK) and 24 h (Cd) were analyzed by method of high throughput sequencing analysis. Also, miRNA with significantly differential expression was screened, and functions of target genes of these miRNA were predicted. On this basis, expression pattern of some miRNA and their target genes were verified by qRT-PCR technology. The results show that in CK and Cd libraries, there are more unannotation sRNA sequences, accounting for 86.4% and 80.5% of total number of their own sRNA unique reads, respectively. Among annotation sRNA sequences, percentage of miRNA is the lowest with a value of 0.3% and 0.5%, respectively, while that of rRNA is the highest with a value of 9.4% and 11.8%, respectively. Length of sRNA in the two libraries is mainly 21-24 nt, and the most of them is 21 nt. Thirty-two miRNA with significantly differential expression are screened from sRNA in root of *I. lactea* var. *chinensis* under Cd stress, in

收稿日期: 2016-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31301807; 31300436); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20130734)

作者简介: 刘凉琴(1990—),女,江苏常州人,硕士研究生,主要从事观赏植物分子育种研究。

①通信作者 E-mail: lzl@njau.edu.cn; chunsun@126.com

which, expression of twenty miRNA is down-regulated (belonging to miR165, miR166, miR167, miR168, miR390 and miR396 families, respectively), that of twelve miRNA is up-regulated. The result of function prediction indicates that functions of target genes of these miRNA are mainly concentrated in three aspects, i. e. biological process, cellular component and molecular function, while from KEGG pathway enrichment analysis, number of target gene of differential expression miRNA enriching in three pathways of ribosome, biosynthesis of amino acids and carbon metabolism is 122, 88 and 82, respectively. Verification result of qRT-PCR shows that between CK and Cd libraries, there are significantly differences in relative expression of eleven miRNA with differential expression and eight target genes ( $P < 0.05$ ). In which, up-regulated and down-regulated trends of relative expression of eleven miRNA are consistent with above screening result, and when relative expression of miRNA is up-regulated, that of its target gene is down-regulated, and *vice versa*, meaning that under Cd stress condition, miRNA from root of *I. lactea* var. *chinensis* negatively regulates its target gene expression, and these target genes mainly are involved in processes of coding transcription factor, HD-ZIP protein and signaling protein, etc.

**Key words:** *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz.; Cd stress; miRNA; target gene; high throughput sequencing; differential expression

MicroRNA (miRNA) 为一类单链、非编码的小分子 RNA, 长度为 20 ~ 24 nt, 在基因表达调控过程中起关键作用<sup>[1-2]</sup>。miRNA 由含有茎环结构的单链 RNA 前体通过 DCL1 加工形成<sup>[1]</sup>; 成熟的 miRNA 可与靶基因结合, 实现对靶基因的抑制或切割<sup>[3]</sup>; miRNA 在植物发育过程中扮演重要角色, 能够调控根的萌发和生长<sup>[4]</sup>, 并可控制叶片形态和极性<sup>[5]</sup> 及花芽分化<sup>[6]</sup> 等。拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中的 miR167 通过调节靶基因 *ARF6* 和 *ARF8* 的表达控制体细胞胚的发生<sup>[7]</sup>; 硝酸盐胁迫下, miR167 通过显著提高靶基因 *ARF8* 的表达量促进侧根的生长发育<sup>[8]</sup>; 棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) 中的 miRNVL5 通过介导 *GhCHR* 基因的表达提高植株的耐盐性, 同时 *GhCHR* 基因的表达量也显著增加<sup>[9]</sup>。

随着工业化进程的加快, 大量耕地受到重金属污染。镉 (Cd) 是毒性最强的重金属元素之一, 土壤中 Cd 含量超标可使农作物的可食部分中累积大量的 Cd, 严重影响农作物的品质, 并威胁人类健康<sup>[10]</sup>。miRNA 能够参与植物对重金属胁迫的响应过程, 并在植物适应重金属胁迫方面发挥重要作用。Gielen 等<sup>[11]</sup> 发现, 拟南芥、欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn.)、水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 和烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 等植物中的 miRNA 对 Cd、As、Al 和 Hg 等重金属胁迫均非常敏感; Xie 等<sup>[12]</sup> 发现, Cd 胁迫下欧洲油菜的多个 miRNA 表达量上升; Zhang 等<sup>[13]</sup> 也发现, Cd 胁迫下, miR395 超表达可阻止 Cd 进入欧洲油菜的地上部分, 提高其对 Cd 的耐性; 水稻中有 19 个 miRNA 可响应 Cd 胁迫, 并且大多数 miRNA 能够参与转录调

控、信号转导及胁迫响应等过程<sup>[14-16]</sup>; Zhou 等<sup>[17]</sup> 从 Cd 胁迫下的蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 中鉴定出 38 个未知 miRNA, 其中 miR529、miR319、miR393 和 miR171 表达量上调, 而 miR398 表达量则下调; Sunkar 等<sup>[18]</sup> 认为, *CSD1* 和 *CSD2* 是拟南芥中 miR398 的靶基因, 受 miR398 负调控表达, *CSD1* 和 *CSD2* 基因表达量的上调能够减轻由 Cd 胁迫引起的氧化胁迫。上述研究结果均显示: miRNA 介导的基因表达在植物抵御重金属胁迫过程中具有不可替代的作用。WAK 基因是 miR604 的靶基因之一, 参与响应重金属胁迫 (Cu、Al、Zn) 和植物防御机制<sup>[19-20]</sup>; miR167 和 miR159 的靶基因分别编码 NRAMP 金属离子转运蛋白和 ABC 转运蛋白, 二者在重金属离子吸收和平衡方面具有关键作用<sup>[21-23]</sup>。

马蔺 [*Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz.] 为重金属超富集植物<sup>[24]</sup>, 是研究植物对重金属抗逆机制的重要物种之一。虽然目前已经从马蔺中克隆获得多个 Cd 耐性相关基因, 并对其基因在 Cd 胁迫下的表达特性进行了研究<sup>[25-26]</sup>, 但有关马蔺 miRNA 调控植株响应和适应重金属胁迫的研究尚未见报道。

鉴于此, 作者采用水培法、用  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 培养马蔺, 采集处理 0 和 24 h 的根系, 分别提取总 RNA 并构建 sRNA 文库; 对 sRNA 文库进行高通量测序, 对响应 Cd 胁迫下差异表达的 miRNAs 进行分析并预测其靶基因的功能; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对预测结果进行验证, 以期为马蔺根系 miRNA 应答重金属胁迫机制 (尤其是应答 Cd 胁迫机制) 的深入研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

使用的马蔺种子由江苏省中国科学院植物研究所鸢尾课题组提供。选取饱满的当年生马蔺种子,用质量分数 0.5% NaClO 溶液消毒 20 min,用自来水冲洗干净并浸种催芽;种子萌发后,以石英砂(用自来水清洗干净)为栽培基质进行播种;待幼苗株高约 10 cm 时,选取长势一致的幼苗进行胁迫实验<sup>[27]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 Cd 胁迫处理方法 采用 1/2Hoagland 营养液对幼苗进行预培养,幼苗用泡沫板固定并培养在塑料瓶中,每瓶 3 株幼苗,共 6 瓶 18 株。预培养 1 周后,向 1/2Hoagland 营养液中加入 CdCl<sub>2</sub> 固体粉末,使营养液中 Cd 终浓度达 100 μmol · L<sup>-1</sup>;在培养 0(CK)和 24 h 时分别采集其中 3 瓶幼苗的根系(每瓶视为 1 个重复),将同一塑料瓶中的 3 株幼苗根系混匀<sup>[28]</sup>,立即用液氮速冻,并置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用。

1.2.2 总 RNA 的提取及 sRNA 文库的构建 采用 RNAiso™ Plus[宝生物工程(大连)有限公司]提取 Cd 胁迫 0 和 24 h 的马蔺根系总 RNA 并构建 sRNA 文库,分别命名为 CK 文库和 Cd 文库;采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System 对 sRNA 文库进行质量检测,并用 Illumina HiSeq™ 2500 超高通量测序系统进行高通量测序,相关检测由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

通过 Base Callin 将原始图像数据转换为序列数据,即为原始数据,并保存在“Fastq”文件中。为获得高质量的序列,从原始序列数据中去除接头序列和质量值 Q ≤ 5 的碱基数占整个 reads 的 50% 以上的低质量序列,将获得的干净序列(clean reads)用于数据分析。miRNA 表达量采用 TPM(transcripts per million)校准<sup>[29]</sup>,计算公式为:miRNA 在文库中的归一化表达量 = (Read count × 10<sup>6</sup>) / Total read count。若 2 个文库中任何 1 个 miRNA 基因的表达量在归一化后为 0,则被修改为 0.01;若 2 个文库中任何 1 个 miRNA 基因的表达量在归一化后小于 1,则表示其表达量较低,不宜进行差异表达分析。根据公式“差异倍数(fold change) = log<sub>2</sub>(Cd 文库中 miRNA 的归一化表达量 / CK 文库中 miRNA 的归一化表达量)”计算 CK 与 Cd 文库 miRNA 表达的差异倍数。

1.2.3 差异表达 miRNA 靶基因的预测 将测得序列与 NCBI 数据库和 Rfam10.0 数据库中水稻和拟南芥的非编码 RNA 进行比对,并将 sRNA 的特异序列(unique reads)与 miRBase21 数据库中所有植物的序列进行 BLASTn 比对<sup>[30]</sup>,只有完全匹配的序列才是保守的 miRNA。根据上述分析结果确定 CK 和 Cd 文库中已知的 miRNA 数量,对已知的差异表达的 miRNA 进行分析,以 |fold change| ≥ 1 且 P ≤ 0.05 作为 miRNA 显著差异表达的筛选条件。

采用 Allen 等<sup>[31]</sup>的方法,根据同源性对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测<sup>[32]</sup>。将成熟的 miRNA 序列用于靶基因序列推测,并对靶基因进行 GO 功能分类和 KEGG 通路富集分析。

1.2.4 差异表达 miRNA 及其靶基因表达模式的 qRT-PCR 验证 在 CK 和 Cd 文库中随机选择 11 个差异表达 miRNA 及 7 个差异表达 miRNA 的靶基因,采用 qRT-PCR 技术对其表达模式进行验证。以成熟的 miRNA 序列为引物(表 1),采用 PrimeScript miRNA qPCR Starter Kit Ver. 2.0[宝生物工程(大连)有限公司]对总 RNA 进行反转录,以 *ITIP41* 基因为内参基因<sup>[33]</sup>;每个重复的总 RNA 样品均进行 3 次 qRT-PCR 扩增(视为 3 个技术性重复)。扩增程序为:95 °C 预变性 120 s;95 °C 变性 10 s、55 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。基因的相对表达量根据 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 计算<sup>[34]</sup>,其中, C<sub>T</sub> 值为每个反应管内荧光信号达到设定阈值时所需要的循环数。

表 1 用于马蔺根系部分 miRNA 及其靶基因 qRT-PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR amplification of some miRNA from root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. and their target genes

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
miR165a	TCCGACCAGGCTTCATCCCC
miR166	TCCGACCAGGCTTCATCCCC
miR167d-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTG
miR168a	TCGCTTGGTGCAGATCGGGAC
miR396f	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG
miR159a	TTTGGACTGAAGGGAGCTCTA
miR535	TGACAACGAGAGAGAGCAGCG
miR894	CGTTTCACGTCGGGTTCACC
miR1511-3p	ACCTGGCTCTGATACCATAAC
miR5139	AAACCTGGCTCTGATACCA
miR8155	TAACCTGGCTCTGATACCA
miR160g	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
miR166i	TCCGACCAGGCTTCATCCCC

## 2 结果和分析

### 2.1 Cd胁迫条件下马蔺根系 sRNA 的高通量测序结果分析

高通量测序结果表明:马蔺根系 CK 和 Cd 文库中 sRNA 的原始序列(raw reads)分别有 6 961 617 和 7 459 170 条;去除接头序列、poly-A 序列、 $\leq 18$  nt 序列和低质量序列后,干净序列分别有 4 819 714 和 4 641 223 条。在 CK 和 Cd 文库中,sRNA 的特异序列分别有 1 326 618 和 1 146 173 条(表 2),其中,能与基因组比对成功的 sRNA 特异序列分别有 519 023 和 532 832 条,分别占各自 sRNA 特异序列总数的 39.1% 和 46.5%。

由表 2 可见:CK 和 Cd 文库中 sRNA 类型较多,

包括 miRNA、rRNA、snRNA、snoRNA、tRNA 和重复序列。其中,CK 和 Cd 文库中未注释的 sRNA 序列分别有 1 145 700 和 922 152 条,分别占各自 sRNA 特异序列总数的 86.4% 和 80.5%;已注释的 sRNA 序列分别有 180 918 和 224 021 条。在已注释的 sRNA 中,rRNA 最多,分别占 CK 和 Cd 文库中 sRNA 特异序列总数的 9.4% 和 11.8%;其次为 tRNA,分别占各自 sRNA 特异序列总数的 2.2% 和 3.1%;miRNA 最少,分别仅占各自 sRNA 特异序列总数的 0.3% 和 0.5%。

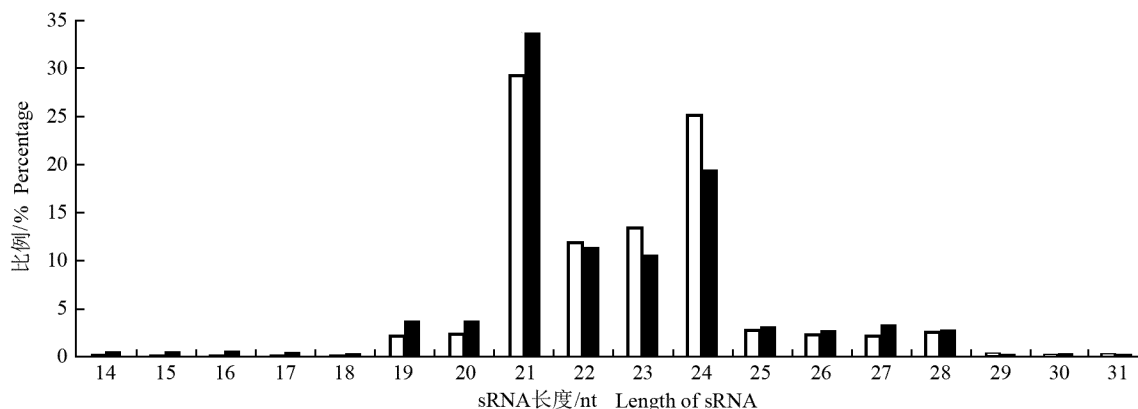
对马蔺根系 CK 和 Cd 文库中 sRNA 长度的分析结果见图 1。由图 1 可以看出:在 CK 和 Cd 文库中,长度为 21 nt 的 sRNA 所占比例最高,分别为 29.1% 和 34.0%;其次是长度为 24 nt 的 sRNA。总体上看,在马蔺根系的 CK 和 Cd 文库中,长度为 21~24 nt 的 sRNA 所占比例较高,分别为 75.7% 和 80.9%。

表 2 Cd胁迫条件下马蔺根系 sRNA 高通量测序结果的分析<sup>1)</sup>

Table 2 Analysis on result of high throughput sequencing of sRNA in root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress<sup>1)</sup>

sRNA 类型 Type of sRNA	CK 文库 CK library		Cd 文库 Cd library	
	数量 Number	比例/% Percentage	数量 Number	比例/% Percentage
miRNA	3 257	0.3	5 312	0.5
rRNA	124 107	9.4	135 819	11.8
snRNA	5 528	0.4	10 664	0.9
snoRNA	7 209	0.5	13 704	1.2
tRNA	29 691	2.2	35 763	3.1
重复序列 Repeat sequence	11 126	0.8	22 759	2.0
未注释序列 Unannotation sequence	1 145 700	86.4	922 152	80.5
总计 Total	1 326 618	100.0	1 146 173	100.0

<sup>1)</sup> CK: 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 h Stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 h; Cd: 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 24 h Stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 24 h.



□: CK 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 h) CK library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 h);  
 ■: Cd 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 24 h) Cd library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 24 h).

图 1 Cd胁迫下马蔺根系 CK 和 Cd 文库中不同长度 sRNA 的比例  
 Fig. 1 Analysis on percentage of sRNA with different lengths in CK and Cd libraries from root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress



## 2.2 Cd 胁迫条件下马蔺根系中显著差异表达 miRNA 的筛选结果

对 Cd 胁迫 0(CK) 和 24 h(Cd) 的马蔺根系中能 与 miRBase 21 数据库中序列完全匹配的已注释的 miRNA 进行统计分析,结果显示其 CK 和 Cd 文库分别包含 104 和 99 个 miRNA 家族。进一步的分析结果(表 3)表明:以  $|\text{fold change}| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  作为筛选条件,确定显著差异表达的 miRNA 有 32 个,其中 20 个 miRNA 下调表达(分别属于 miR165、miR166、miR167、miR168、miR390 和 miR396 家族),12 个

miRNA 上调表达。

## 2.3 Cd 胁迫条件下马蔺根系中差异表达 miRNA 靶基因功能的预测结果

利用 GO 功能分类对 Cd 胁迫条件下马蔺根系中差异表达的 miRNA 靶基因进行功能预测,结果(图 2)表明:大部分差异表达 miRNA 靶基因的功能主要集中在生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面。

在生物学过程中,差异表达 miRNA 靶基因的功能主要集中在氧化还原过程(oxidation-reduction process)、以 DNA 为模板的转录调控(regulation of

表 3 Cd 胁迫条件下马蔺根系中显著差异表达 miRNA 的表达特性分析

Table 3 Analysis on expression character of miRNA with significantly differential expression in root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress

miRNA 名称 <sup>1)</sup> miRNA name <sup>1)</sup>	在不同文库中的表达量 <sup>2)</sup> Expression in different libraries <sup>2)</sup>		差异倍数 Fold change	调控类型 Type of regulation
	CK 文库 CK library	Cd 文库 Cd library		
miR165a	787.39	175.60	-2.16	下调 Down-regulated
miR166j	6.22	1.51	-2.05	下调 Down-regulated
miR166i	487.37	124.32	-1.97	下调 Down-regulated
miR166a	38 190.44	9 757.13	-1.97	下调 Down-regulated
miR166	37 979.01	9 750.23	-1.96	下调 Down-regulated
miR166e-3p	135.28	35.55	-1.93	下调 Down-regulated
miR166j-3p	85.07	22.62	-1.91	下调 Down-regulated
miR166u	259.14	71.32	-1.86	下调 Down-regulated
miR166m	97.72	29.09	-1.75	下调 Down-regulated
miR166b	118.06	37.06	-1.67	下调 Down-regulated
miR165a-3p	3.32	1.08	-1.62	下调 Down-regulated
miR166g-3p	143.58	47.19	-1.61	下调 Down-regulated
miR166h-3p	81 853.61	27 682.79	-1.56	下调 Down-regulated
miR166n	44.61	15.30	-1.54	下调 Down-regulated
miR167d-5p	6.22	2.37	-1.39	下调 Down-regulated
miR166k	41.08	17.02	-1.27	下调 Down-regulated
miR390a	4.15	1.72	-1.27	下调 Down-regulated
miR396f	1 175.80	515.17	-1.19	下调 Down-regulated
miR168a-3p	117.85	53.43	-1.14	下调 Down-regulated
miR168a	143.37	69.59	-1.04	下调 Down-regulated
miR535	27.59	58.61	1.09	上调 Up-regulated
miR535a	28.63	61.41	1.10	上调 Up-regulated
miR159a	736.97	1 605.40	1.12	上调 Up-regulated
miR8155	5.81	12.71	1.13	上调 Up-regulated
miR5139	8.09	18.10	1.16	上调 Up-regulated
miR1511-3p	3.32	7.76	1.22	上调 Up-regulated
miR159-3p	2.49	5.82	1.22	上调 Up-regulated
miR159b	31.33	74.12	1.24	上调 Up-regulated
miR160g	1.24	3.88	1.64	上调 Up-regulated
miR894	20.54	78.21	1.93	上调 Up-regulated
miR396b-3p	3.73	14.44	1.95	上调 Up-regulated
miR2916	0.41	2.37	2.51	上调 Up-regulated

<sup>1)</sup> 表中的 miRNA 均满足  $P \leq 0.05$  且  $|\text{fold change}| \geq 1$  的条件 All of miRNA in the table satisfied the condition of  $P \leq 0.05$  and  $|\text{fold change}| \geq 1$ .

<sup>2)</sup> 为归一化后的表达量 Expression after normalization. CK:  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 h Stressed by  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 h; Cd:  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 24 h Stressed by  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 24 h.

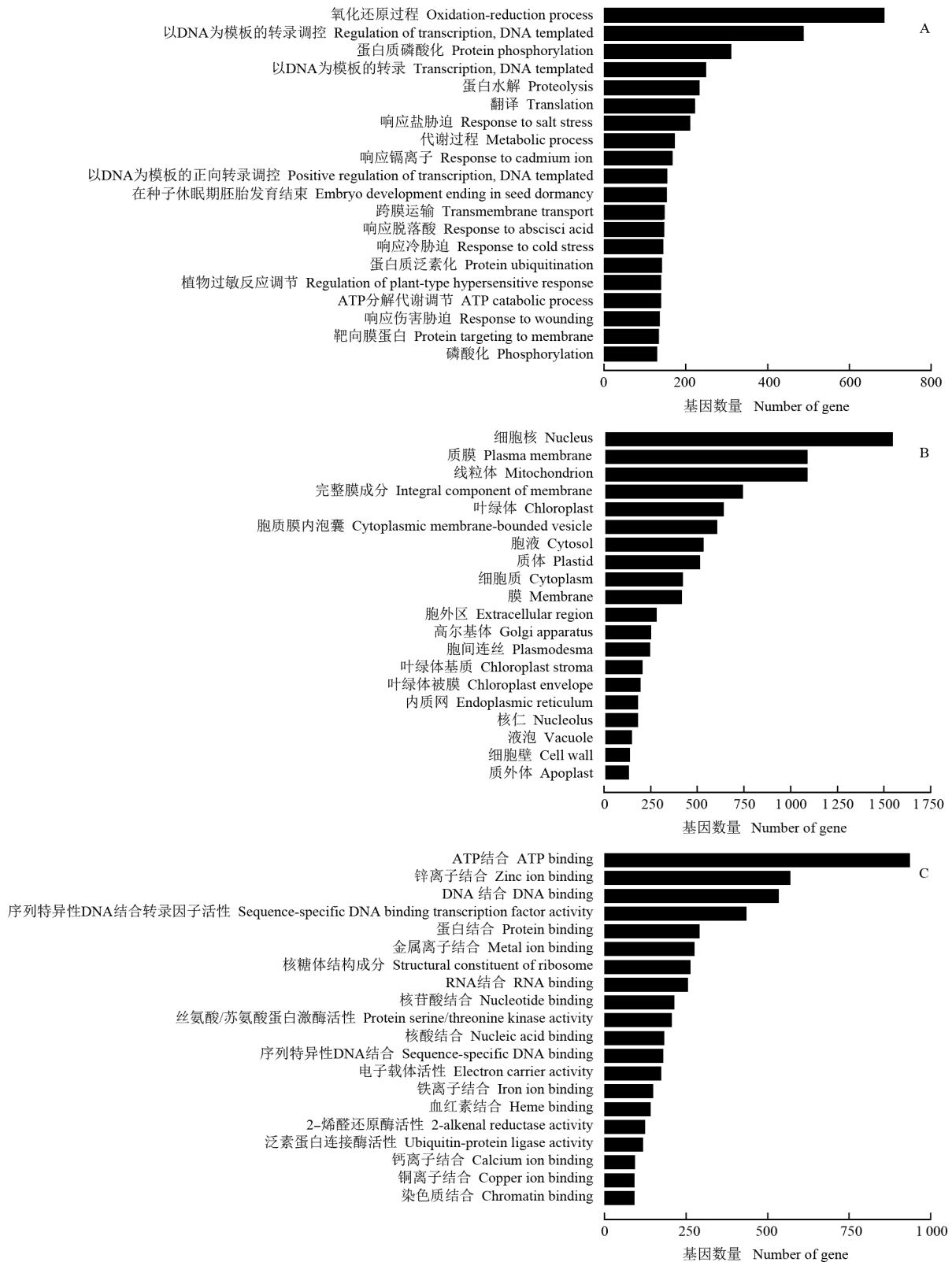


图 2 Cd 胁迫条件下马蔺根系中涉及生物学过程 (A)、细胞组分 (B) 和分子功能 (C) 的差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能分类结果  
 Fig. 2 Result of GO function classification on target genes of differential expression miRNA related to biological process (A), cellular component (B) and molecular function (C) in root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress

transcription, DNA templated) 和蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation) 等过程 (图 2-A); 在细胞组分中, 细胞核 (nucleus)、质膜 (plasma membrane) 和线粒体 (mitochondrion) 中的差异表达 miRNA 靶基因较多 (图 2-B); 而在分子功能中, 多数差异表达 miRNA 靶基因与结合功能有关, 与 ATP 结合有关的 miRNA 靶基因最多, 其次是与锌离子结合的靶基因 (图 2-C)。

对马蔺根系中差异表达的 miRNA 靶基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果见图 3。结果显示: 富集差异表达 miRNA 靶基因数量最多的通路依次为核糖体 (ribosome)、氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids) 和碳代谢 (carbon metabolism), 3 个通路富集的差异表达 miRNA 靶基因数分别为 122、88 和 82 个。

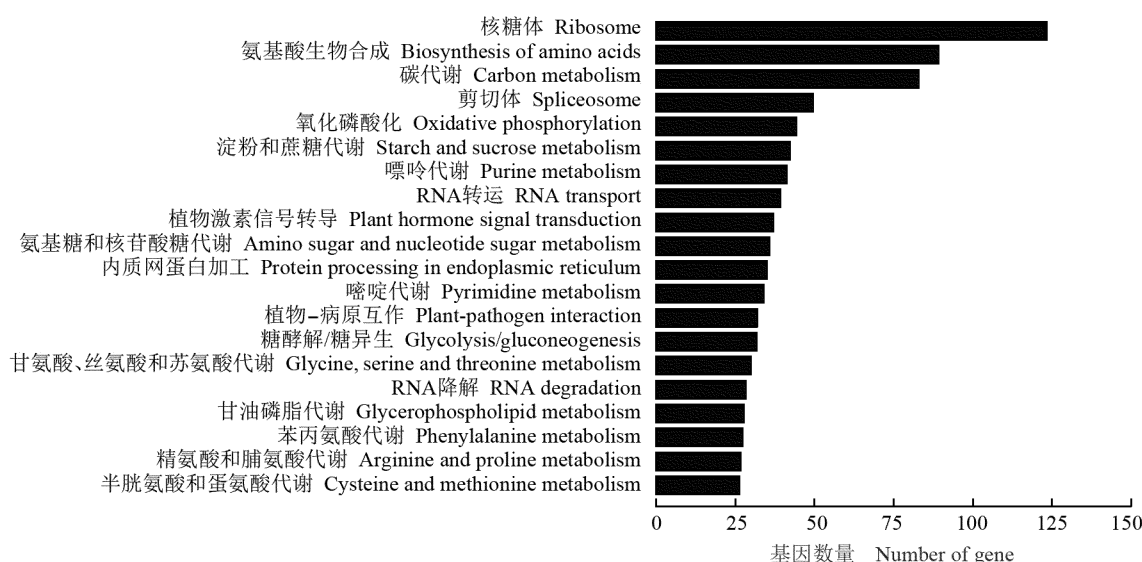


图 3 Cd 胁迫条件下马蔺根系中差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析的结果  
Fig. 3 Result on KEGG pathway enrichment analysis of target genes of differential expression miRNA in root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress

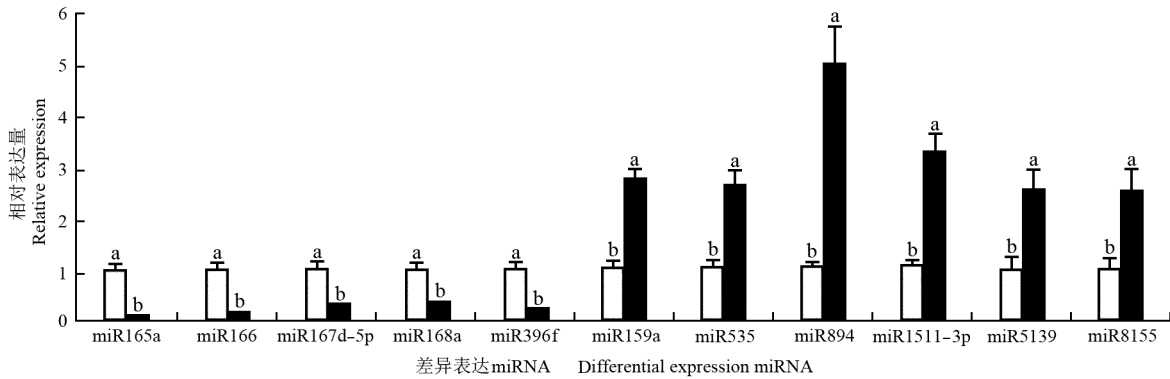
## 2.4 Cd 胁迫条件下马蔺根系中差异表达 miRNA 及其靶基因表达模式的 qRT-PCR 验证结果

2.4.1 差异表达 miRNA 表达模式的验证结果 对 Cd 胁迫条件下马蔺根系 CK 和 Cd 文库中 5 个下调表达的 miRNA (包括 miR165a、miR166、miR167d-5p、miR168a 和 miR396f) 和 6 个上调表达的 miRNA (包括 miR159a、miR535、miR894、miR1511-3p、miR5139 和 miR8155) 进行 qRT-PCR 验证, 结果见图 4。结果显示: CK 和 Cd 文库间供试 11 个差异表达 miRNA 的相对表达量均有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 虽然这 11 个 miRNA 的表达水平差异与表 3 中的数据并不完全匹配, 但是表达的上调和下调趋势一致, 说明高通量测序结果可靠。

2.4.2 差异表达 miRNA 靶基因表达模式的验证结果 对 Cd 胁迫下马蔺根系 CK 和 Cd 文库中 7 个差异表达 miRNA (包括 miR396f、miR165a、miR166、miR166i、miR160g、miR1511-3p 和 miR159a) 的 8 个

靶基因 (其中 miR159a 有 2 个靶基因) 的表达模式进行 qRT-PCR 验证, 结果见图 5。结果表明: miR396f 的靶基因 *comp281813* 编码生长调节因子 5, miR165a 的靶基因 *comp250130* 编码 HD-ZIP 蛋白 ATHB-15, miR166 的靶基因 *comp329160* 编码 HD-ZIP 蛋白 HOX32, miR166i 的靶基因 *comp311396* 编码转录因子 PCF6, miR160g 的靶基因 *comp357989* 编码生长素响应因子 17, miR1511-3p 的靶基因 *comp120421* 编码细胞分裂蛋白 SepF, miR159a 的靶基因 *comp239971* 和 *comp350997* 分别编码细胞色素 C 氧化酶亚基 3 和转录因子 GAMYB。

由图 5 还可见: 在 CK 和 Cd 文库间, 靶基因 *comp311396* 的相对表达量无显著差异, 其余靶基因的相对表达量均存在显著差异。另外, 在 CK 文库中未检测到靶基因 *comp281813* 和 *comp250130* 的表达, 而且在 Cd 文库中也未检测到靶基因 *comp120421* 和 *comp239971* 的表达。

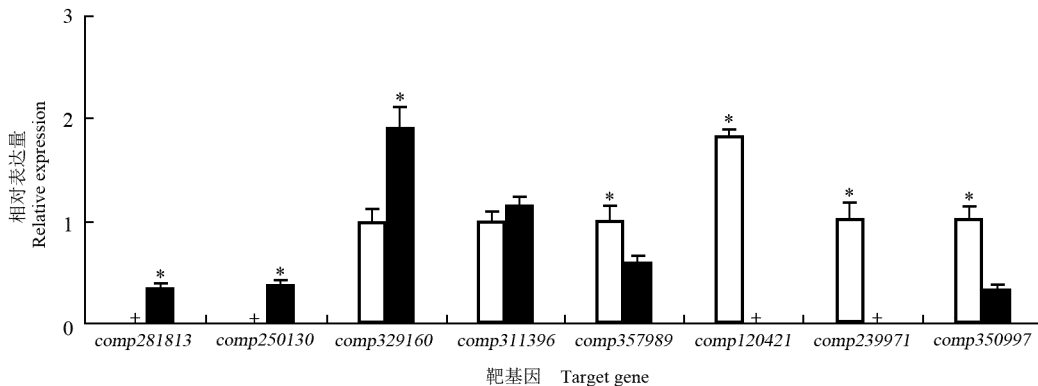


□: CK 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 h) CK library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 h);  
 ■: Cd 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 24 h) Cd library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 24 h).

不同小写字母表示不同文库间同一类 miRNA 的相对表达量有显著差异 ( $P < 0.05$ ) Different small letters indicate the significant difference in relative expressions of the same miRNA among different libraries.

图 4 Cd 胁迫条件下马蔺根系 sRNA 文库中 11 个差异表达 miRNA 的相对表达量比较

Fig. 4 Comparison on relative expression of eleven differential expression miRNAs in sRNA libraries from root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress



□: CK 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 h) CK library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 0 h);  
 ■: Cd 文库(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 24 h) Cd library (stressed by 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd for 24 h).

comp281813: miR396f 的靶基因 Target gene of miR396f; comp250130: miR165a 的靶基因 Target gene of miR165a; comp329160: miR166 的靶基因 Target gene of miR166; comp311396: miR166i 的靶基因 Target gene of miR166i; comp357989: miR160g 的靶基因 Target gene of miR160g; comp120421: miR1511-3p 的靶基因 Target gene of miR1511-3p; comp239971, comp350997: miR159a 的靶基因 Target gene of miR159a. +: 未检出 Undetected; \*: 表示不同文库间同一靶基因的相对表达量有显著差异 ( $P < 0.05$ ) Indicating the significant difference in relative expressions of the same target gene among different libraries.

图 5 Cd 胁迫条件下马蔺根系 sRNA 文库中 7 个差异表达 miRNA 的靶基因相对表达量的比较

Fig. 5 Comparison on relative expression of target genes of seven differential expression miRNAs in sRNA libraries from root of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. under Cd stress

### 3 讨论和结论

不同植物中的 sRNA 存在一定差异。本研究中, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫 0 (对照) 和 24 h, 马蔺根系的 sRNA 长度均以 21 和 24 nt 为主, 并且前者最多。相关研究结果显示: 萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.) 中的

sRNA 长度以 21 和 24 nt 为主<sup>[35]</sup>; 番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.)<sup>[36]</sup> 和枳 [*Poncirus trifoliata* (Linn.) Raf.]<sup>[37]</sup> 的 sRNA 长度以 21 nt 为最多, 而拟南芥<sup>[38]</sup> 中的 sRNA 长度则以 24 nt 为最多。表明不同植物的 sRNA 长度和含量存在差异, 可能与植物种类及参与 sRNA 生物合成的酶不同有关。高通量测序结果显示: 马蔺根系 CK 和 Cd 文库中 sRNA 类型丰富; 2 个



文库的已注释 sRNA 中, rRNA 比例均最高(9.4% 和 11.8%), miRNA 比例均最低(0.3% 和 0.5%), 而未注释的 sRNA 比例均在 80% 以上, 说明马蔺根系中未知的 sRNA 数量较多, 有待进一步深入研究。

研究结果表明:  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cd 胁迫条件下, 马蔺根系中共有 32 个 miRNA 显著差异表达, 其中 miR165a、miR166、miR167d-5p、miR168a 和 miR396f 等 20 个 miRNA 下调表达, 其余 12 个 miRNA 上调表达。在 Cd 胁迫条件下, 水稻的 miR166、miR168 和 miR396 下调表达<sup>[14]</sup>, 蒺藜苜蓿的 miR166 也下调表达<sup>[17]</sup>; 在非生物胁迫(盐、干旱和冷害胁迫)条件下, 拟南芥的 miR168 和 miR396 上调表达<sup>[39]</sup>。Cd 胁迫条件下, 不同植物同一家族 miRNA 的表达水平也存在差异<sup>[12,40-41]</sup>。马蔺根系中的 miR159a 和 miR894 受 Cd 胁迫诱导表达, 这与 Zhang 等<sup>[42]</sup>的研究结果一致。根据本研究结果及上述文献报道, 推测 miR166、miR168 和 miR396 可能介导了植物对各种非生物胁迫的响应, 并且, 植物体内不同 miRNA 对非生物胁迫的响应具有特异性, 但许多 miRNA 的调控机制尚未明确, 有待深入研究。

对 Cd 胁迫条件下马蔺根系中差异表达的 miRNA 靶基因功能的预测结果表明: 7 个差异表达 miRNA 的靶基因主要参与编码转录因子、HD-ZIP 蛋白和信号蛋白等。而对 miRNA 及其靶基因表达状况的比较结果表明: 当 miRNA 表达水平上调时, 其靶基因的相对表达量降低; 而当 miRNA 表达水平下调时, 其靶基因的相对表达量则升高。说明 Cd 胁迫条件下马蔺根系中这些差异表达的 miRNA 对其靶基因具有负调控作用, 并说明本研究对差异表达 miRNA 靶基因的预测结果可靠。HD-ZIP 蛋白在植物器官发育过程中起重要作用<sup>[43-45]</sup>, 马蔺根系中 miR166 的靶基因编码 HD-ZIP HOX32 蛋白, 据此推测 miR166 可能参与马蔺的器官发育; 马蔺根系中 miR165a 的靶基因编码 HD-ZIP ATHB-15 蛋白, 而该蛋白已被证实与植物响应胁迫有关<sup>[46-47]</sup>。生长素响应因子 ARF17 在生长素信号通路中发挥作用<sup>[18]</sup>, 该转录因子由马蔺 miR160g 的靶基因所编码, 能够响应 Cd 胁迫; 而 miR160 家族不同成员通过调控 ARFs 响应不同类型的环境胁迫<sup>[35,37,48]</sup>, 因而, miR160 在调控植物生长发育和植物响应各种非生物胁迫过程中发挥重要作用, 但不同植物的 miR160 对胁迫的响应机制尚待进一步探究。Cd 胁迫条件下, 马蔺根系中 miR159a 负调控 2 个靶基因

(编码转录因子 GAMYB 和细胞色素 C 氧化酶亚基 3) 的表达, 小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 根和叶中的 miR159 负调控靶基因 MYB3 的表达<sup>[49]</sup>, 拟南芥中的 miR159 抑制靶基因 MYB33 和 MYB65 的表达<sup>[50]</sup>; 此外, 萝卜根系中的 miR159 靶向调控 ABC 转运蛋白, 而该转运蛋白在植物对重金属离子的吸收与转运过程中发挥关键作用<sup>[51]</sup>, 据此推测 miR159 可能参与植物的应激反应。

综合分析结果表明: 马蔺根系中未注释的 sRNA 序列较多, 且在已注释的 sRNA 序列中 rRNA 所占比例最高, 而 miRNA 所占比例最低; 其 sRNA 长度主要集中在 21 ~ 24 nt, 并以 21 nt 为最多。通过高通量测序筛选出 32 个显著差异表达的 miRNA, 其中, 20 个 miRNA 下调表达, 12 个 miRNA 上调表达。马蔺根系 miRNA 靶基因的功能主要集中在生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面; 其 miRNA 均对靶基因的表达具有负调控作用, 并且这些靶基因主要参与编码转录因子、HD-ZIP 蛋白和信号蛋白等过程。

#### 参考文献:

- [1] BARTEL D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [2] VOINNET O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs [J]. Cell, 2009, 136: 669-687.
- [3] RHOADES M W, REINHART B J, LIM L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell, 2002, 110: 513-520.
- [4] MARIN E, JOUANNET V, HERZ A, et al. miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth[J]. The Plant Cell, 2010, 22: 1104-1117.
- [5] MALLORY A C, REINHART B J, JONES-RHOADES M W, et al. MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region[J]. The EMBO Journal, 2004, 23: 3356-3364.
- [6] CHUCK G, MEELEY R, HAKE S. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize *AP2* genes *ids1* and *sid1* [J]. Development, 2008, 135: 3013-3019.
- [7] SU Y H, LIU Y B, ZHOU C, et al. The microRNA167 controls somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through regulating its target genes *ARF6* and *ARF8* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2016, 124: 405-417.
- [8] GIFFORD M L, DEAN A, GUTIERREZ R A, et al. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105: 803-808.
- [9] GAO S, YANG L, ZENG H Q, et al. A cotton miRNA is involved in regulation of plant response to salt stress[J]. Scientific Reports,

- 2016, 6: e19736.
- [10] FOWLER B A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238: 294–300.
- [11] GIELEN H, REMANS T, VANGRONVELD J, et al. MicroRNAs in metal stress: specific roles or secondary responses? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13: 15826–15847.
- [12] XIE F L, HUANG S Q, GUO K, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus* [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 1464–1474.
- [13] ZHANG L W, SONG J B, SHU X X, et al. miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 250/251: 204–211.
- [14] DING Y F, CHEN Z, ZHU C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62: 3563–3573.
- [15] MENG Y J, CHEN D J, MA X X, et al. Mechanisms of microRNA-mediated auxin signaling inferred from the rice mutant *osaxr* [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2010, 5: 252–254.
- [16] LI T, LI H, ZHANG Y X, et al. Identification and analysis of seven H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: 2821–2833.
- [17] ZHOU Z S, HUANG S Q, YANG Z M. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374: 538–542.
- [18] SUNKAR R, KAPOOR A, ZHU J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 2051–2065.
- [19] SIVAGURU M, EZAKI B, HE Z H, et al. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132: 2256–2266.
- [20] HOU X W, TONG H Y, SELBY J, et al. Involvement of a cell wall-associated kinase, WAK14, in *Arabidopsis* mineral responses [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1704–1716.
- [21] BOVET L, EGGMANN T, MEYLAND-BETTEX M, et al. Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: induction of *AtMRP3* [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 371–381.
- [22] TALKE I N, HANIKENNE M, KRÄMER U. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142: 148–167.
- [23] KRÄMER U, TALKE I N, HANIKENNE M. Transition metal transport [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2263–2272.
- [24] HAN Y L, HUANG S Z, GU J G, et al. Tolerance and accumulation of lead by species of *Iris* L. [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17: 853–859.
- [25] GU C S, LIU L Q, ZHAO Y H, et al. Overexpression of *Iris lactea* var. *chinensis* metallothionein *lMT2a* enhances cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 105: 22–28.
- [26] GU C S, LIU L Q, DENG Y M, et al. The heterologous expression of the *Iris lactea* var. *chinensis* type 2 metallothionein *lMT2b* gene enhances copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, 94: 247–253.
- [27] 郭智, 黄苏珍, 原海燕. Cd胁迫对马蔺和鸢尾幼苗生长、Cd积累及微量元素吸收的影响 [J]. *生态环境*, 2008, 17(2): 651–656.
- [28] TIAN S Q, GU C S, LIU L Q, et al. Transcriptome profiling of *Louisiana iris* root and identification of genes involved in lead-stress response [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 28087–28097.
- [29] ZHOU L, CHEN J H, LI Z Z, et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e15224.
- [30] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: 68–73.
- [31] ALLEN E, XIE Z X, GUSTAFSON A M, et al. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants [J]. *Cell*, 2005, 121: 207–221.
- [32] BONNET E, WUYTS J, ROUZÉ P, et al. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 11511–11516.
- [33] GU C S, LIU L Q, DENG Y M, et al. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in *Iris lactea* var. *chinensis* leaves under different experimental conditions [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 175: 144–149.
- [34] 汪仁, 蔡黎丽, 徐晟, 等. 石蒜 Mg<sup>2+</sup>转运体基因 *LtMGT* 的克隆与分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(4): 1–7.
- [35] SUN X C, XU L, WANG Y, et al. Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 197.
- [36] MOXON S, JING R C, SZITTYA G, et al. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening [J]. *Genome Research*, 2008, 18: 1602–1609.
- [37] ZHANG X N, LI X, LIU J H. Identification of conserved and novel cold-responsive microRNAs in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) using high-throughput sequencing [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32: 328–341.

- [38] KASSCHAU K D, FAHLGREN N, CHAPMAN E J, et al. Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs [J]. *PLoS Biology*, 2007, 5: e57.
- [39] LIU H H, TIAN X, LI Y J, et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. *RNA*, 2008, 14: 836–843.
- [40] XU L, WANG Y, ZHAI L L, et al. Genome-wide identification and characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in radish (*Raphanus sativus* L.) roots [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 4271–4287.
- [41] FANG X L, ZHAO Y Y, MA Q B, et al. Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e81471.
- [42] ZHANG Q, ZHAO C Z, LI M, et al. Genome-wide identification of *Thellungiella salsuginea* microRNAs with putative roles in the salt stress response [J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 180.
- [43] HAWKER N P, BOWMAN J L. Roles for class III *HD-Zip* and *KANADI* genes in *Arabidopsis* root development [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135: 2261–2270.
- [44] PRIGGE M J, OTSUGA D, ALONSO J M, et al. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 61–76.
- [45] BARVKAR V T, PARDESHI V C, KALE S M, et al. Genome-wide identification and characterization of microRNA genes and their targets in flax (*Linum usitatissimum*) [J]. *Planta*, 2013, 237: 1149–1161.
- [46] AGALOU A, PURWANTOMO S, ÖVERNÄS E, et al. A genome-wide survey of *HD-Zip* genes in rice and analysis of drought-responsive family members [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66: 87–103.
- [47] DAI M Q, HU Y F, MA Q, et al. Functional analysis of rice *HOMEBOX4* (*Oshox4*) gene reveals a negative function in gibberellin responses [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66: 289–301.
- [48] ELDEM V, AKÇAY U Ç, OZHUNER E, et al. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e50298.
- [49] QIU Z B, HAI B Z, GUO J L, et al. Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 101: 60–67.
- [50] ALLEN R S, LI J Y, STAHLER M I, et al. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 16371–16376.
- [51] CAO F B, CHEN F, SUN H Y, et al. Genome-wide transcriptome and functional analysis of two contrasting genotypes reveals key genes for cadmium tolerance in barley [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 611.

(责任编辑: 佟金凤)

## 《林产化学与工业》2017年征订启事

《林产化学与工业》于1981年创刊,由中国林业科学研究院林产化学工业研究所、中国林学会林产化学化工分会共同主办,为全国林产化工行业的学术类期刊。报道范围:可再生的木质和非木质生物质资源的化学加工与利用。研究领域为生物质能源、生物质化学品、生物质新材料、生物质天然活性成分和制浆造纸等,主要包括松脂化学、生物质能源化学、生物质炭材料、生物基功能高分子材料、胶黏剂化学、森林植物资源提取物化学利用、环境保护工程、木材制浆造纸为主的林纸一体化和林产化学工程设备研究设计等的最新研究成果。

本刊现被《化学文摘》(CA核心)、“乌利希国际期刊指南”、《英联邦农业和生物科学文摘》(CAB Abstracts)、《全球健康》、《皇家化学学会系列文摘》(RSC)、《文摘杂志》(PЖ)等国外数据库收录;被“中国科学引文数据库(CSCD)核心库”、

“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“RCCSE中国核心学术期刊(A)”、“中国农业核心期刊”、“中国期刊全文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”、“万方数据——数字化期刊群”、“中文科技期刊数据库”、“中国核心期刊(遴选)数据库”、《中国学术期刊文摘》等国内10多种大型刊库收录。

本刊为双月刊,双月月末出版,大16开本;国际标准连续出版物号ISSN 0253-2417,国内统一连续出版物号CN 32-1149/S。国内外公开发行,国内邮发代号28-59,国外发行代号Q5941。国内每期定价15元人民币,全年定价90元人民币;国外每期定价15美元,全年定价90美元。编辑部地址:江苏省南京市锁金五村16号林化所内(邮编210042)。电话:025-85482493;传真:025-85482493;E-mail: cifp@vip.163.com;网址: http://www.cifp.ac.cn。