

王玉林,原红军,扎桑,杨春葆,徐齐君. microRNA 调控膜系统及离子转运介导青稞盐碱胁迫的应答[JOL]. 大麦与谷类科学, 2020,37(4):7-14. <https://doi.org/10.14069/j.cnki.32-1769/s.2020.04.002>.

microRNA 调控膜系统及离子转运介导青稞盐碱胁迫的应答

王玉林,原红军,扎桑,杨春葆,徐齐君*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏拉萨 850032)

摘要:盐碱胁迫是影响作物生长和生产的最严重的非生物胁迫之一。青稞作为青藏高原地区生长的裸大麦,对极端环境适应性强,其盐碱胁迫下 microRNA(miRNA)调控机理的研究可为植物盐碱逆境胁迫应答提供重要的参考。本研究利用高通量测序技术,通过对盐碱胁迫及对照处理的青稞进行 miRNA 测序,挖掘青稞 miRNA 在盐碱环境下的调控网络。研究鉴定了 13 757 个 miRNAs,其中 225 个在普通大麦中也存在。miRNA 靶基因的功能富集分析表明,盐碱胁迫响应 miRNAs 的潜在靶基因与膜系统及离子转运的生物学过程相关,表明膜系统的形成与离子转运对青稞的盐碱应答发挥着重要的作用。

关键词:miRNA;青稞;盐碱胁迫

中图分类号:S512.3;Q74

文献标志码:A

文章编号:1673-6486-20200744

青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum*)是我国西部青藏高原常年种植的主要粮食作物和重要性畜饲料来源^[1],约占该地区粮食播种面积的 80%左右。但是,由于对青稞食品需求量的增加以及气候变化的严重影响,青稞产量的提高对满足青藏高原地区粮食消费需求有着重要的意义^[2]。青稞生长在极端环境,因此对非生物胁迫有着独特的适应机理。

土壤盐碱化是一种严重的非生物胁迫,影响作物生长并造成世界范围内作物产量损失^[3]。据估计,在未来几十年中,盐碱胁迫可能会影响越来越多的耕地^[4],并使植物遭到渗透胁迫、高 pH 胁迫和离子毒性。为了应对高盐碱胁迫,植物通过复杂的基因调控网络作出反应,改变基因表达水平并参与膜运输、信号转导和能量代谢相关的翻译后修饰^[5-6]。但是,目前对植物盐碱反应的分子机制了解甚少,提高农作物的盐碱耐受性是一个重要的全球性问题。

MicroRNA(miRNA)属于一类小的单链 RNA,它们在转录后水平上负调控基因表达^[7]。许多研究表明,植物 miRNA 在应对非生物胁迫中起重要作用^[8-9],如盐碱胁迫^[10-12]。近年来,miRNA 在模式植物和几种谷

物中介导与胁迫适应相关基因的调控通路^[13]。研究表明,不同植物物种在盐碱胁迫下可能具有不同的 miRNA 介导的调控策略。高通量测序技术已广泛用于 miRNA 鉴定^[13-15],为青稞盐碱响应的 miRNA 检测及研究提供了很好的技术支持。

本研究的目的是在青稞中鉴定盐碱胁迫响应相关的 miRNA,预测其靶标以及探索检测到的 miRNA 的功能,并揭示 miRNA 的表达和调控模式。研究结果可为进一步验证青稞在盐碱胁迫下的 miRNA-mRNA 调控模式提供重要的信息,并为解析青稞和其他农作物中盐碱胁迫响应的分子机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和盐碱处理

本研究以青稞地方品种 0119 和 0226 作为材料,其中 0119 对盐碱胁迫具有很高的抗性,而 0226 对盐碱胁迫敏感^[16]。用 2% H₂O₂ 将种子表面灭菌 30 min,再用无菌水冲洗,放在 25 °C 的黑暗环境下潮湿的薄纸中 2 d。然后将发芽的幼苗转移至温室中的 Hoagland 营养液中,光温条件分别为 14 h(光照)/10 h(黑暗)和 22 °C(光照)/20 °C(黑暗)。盐碱胁迫处理,将 2 个材料的 3 周龄幼苗中的 1/2 移至添加了 200 mmol/L Na⁺ (NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 物质的量之比为 1:1)的培养液中 72 h。其余 1/2 植物作为对

收稿日期:2020-06-04

基金项目:西藏财政专项(2017CZZX002);国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05)。

作者简介:王玉林(1986—),男,硕士,副研究员,研究方向为青稞遗传育种。E-mail: wangyulin8609@126.com。

* 通信作者:徐齐君(1984—),女,硕士,副研究员,研究方向为青稞遗传育种。E-mail: xqj18100988236@126.com。

照生长在 Hoagland 营养液中。

1.2 总 RNA 提取和 miRNA 文库的构建

分别取 2 个材料在盐碱胁迫(2、8、24、48、72 h)和对照(0、2、8、24、48、72 h)处理后的植株新鲜叶片,使用 Trizol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)从中提取总 RNA, 并使用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, 美国)纯化。RNA 样品的浓度和质量使用 Nano Drop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Inc.)通过测量 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比例来确定。将纯化的高质量 RNA 溶于无 RNase 的水中。取 $10 \mu\text{g}$ 总 RNA 样品,通过 PAGE 凝胶选择 8~30 个核苷酸的 RNA 片段。将 RNA 片段连接至 5' 接头和 3' 接头,通过 PAGE 凝胶再次过滤片段大小。使用 One Step Primer Script miRNA cDNA 合成试剂盒(Trans Gen)对连接的 RNA 进行 RT-PCR,产生 cDNA 产物。cDNA 文库通过凝胶纯化,并用安捷伦(美国,加利福尼亚州圣克拉拉)生物分析仪 2100 进行验证。最终使用 HiSeq2000 (Illumina)对文库进行深度测序。每个处理的每个时间点取 3 个生物学重复。本研究使用的原始序列数据已提交 GSA(Genome Sequence Archive)数据库^[7]及中国科学院北京基因组研究所(BIG)生命与健康大数据中心(2019 年会员),注册号为 CRA001345,可在 <http://bigd.big.ac.cn/gsa> 上公开访问。

1.3 miRNA 的鉴定和基因表达谱分析

对原始数据去接头^[9]、过滤低质量读长序列之后,将 miRNA 读长检测序列与青稞参考基因组进行比对^[8],使用 miRDeep2 (<https://github.com/rajewsky-lab/mirdeep2>)软件鉴定青稞 miRNA。在所有样品中,miRNA 读数均大于 66,以此识别候选 miRNA。使用 BLAST 将这些潜在的 miRNA 与 Rfam 数据库进行比对^[20](版本:10.1),鉴定其他 ncRNA(非编码 RNA)。为了鉴定已知的 miRNA,使用 BLAST 将潜在的 miRNA 标签与 miRBase 中存在的成熟 miRNA 进行比对^[21],不超过 2 个错配的 miRNA 被认为是已知的 miRNA。DESeq2 R 包^[22]用于鉴定差异表达的基因。显著性变化的阈值为 fold-change (倍数变化) > 2 ,校正后的 P 值 < 0.05 。

1.4 靶基因预测和靶功能富集分析

使用 psRobot(v1.2, <http://omicslab.genetics.ac.cn/psRobot/downloads.php>)软件在默认参数下预测 miRNA 的靶基因。使用 Cytoscape 3.6.1 可视化 miRNA-mRNA 调控网络^[23]。使用 Top GO R 包^[24]对显著差异表达的 miRNA 的靶基因进行功能分类和

富集分析。

2 结果与分析

2.1 青稞 miRNA 的鉴定

对于所有 66 个 miRNA 文库,在将低质量读长序列和接头序列进行过滤后,共剩余 897 112 430 条净读长序列(clean reads),每个文库的读长总数范围为 9 908 031~20 151 566 条,唯一读长数目范围为 1 059 453~5 097 449 条。最丰富的 miRNA 的长度范围为 20~24 个核苷酸,最常见的 miRNA 的长度为 21 和 24 个核苷酸。读长比率为 58.01%~92.76%。在 66 个样品中,共 13 757 个潜在的 miRNA 有表达。在本分析中,与其他非编码 RNA 类型匹配的 miRNA 标签被去除,但是没有潜在的 miRNA 标签映射到 Rfam 数据库(<http://rfam.xfam.org/>)。分布在单个染色体上的 miRNA 数量在 1 513(第 4 染色体)与 1 996(第 2 染色体)之间,并且这些 miRNA 大致均匀地分布在整个染色体上。在本研究所有文库中,miRNA 的相对表达水平分布为 66~7 821 211 个读长。

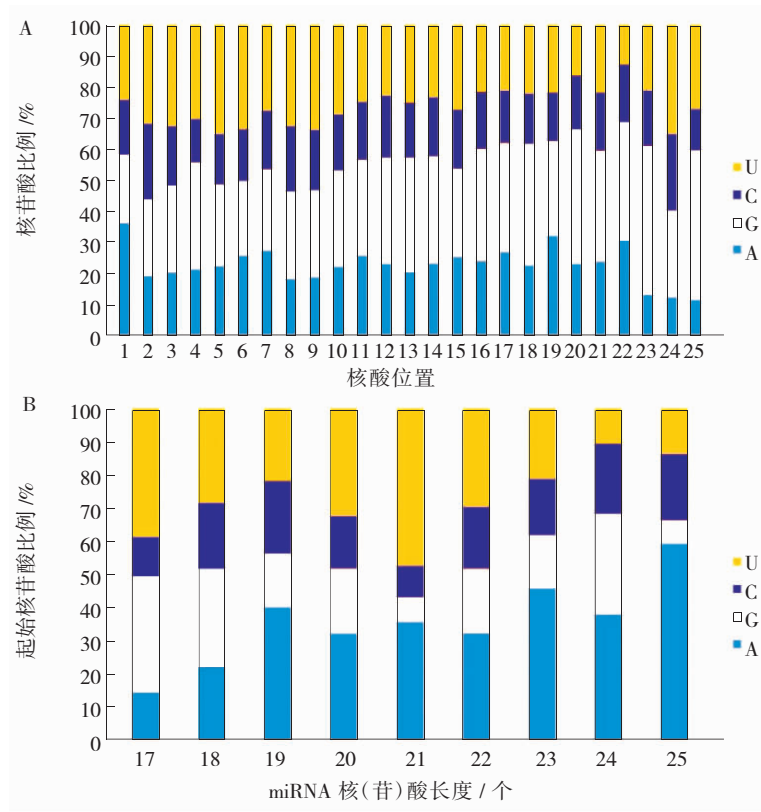
2.2 已知和新 miRNA 的 BLAST 比对

使用 BLAST 将潜在的 miRNA 序列与 miRBase 中公开的 miRNA 序列进行比较^[3],鉴定已知的 miRNA,结果显示:有 225 个 miRNA 在 miRBase 中是保守的,主要分布在 hvu-miR5049 和 hvu-miR1436 家族;其余的 13 532 个 miRNA 是推定的新型 miRNA。长度在 20~24 个核苷酸的 miRNA 数量为 11 759,其中 28.3%长度为 21 个核苷酸,53.7%长度为 24 个核苷酸。miRNA 前体的长度为 34~113 个核苷酸,平均长度为 72 个核苷酸。

计算所有 miRNA 的核苷酸组成,核苷酸中腺嘌呤(A)为 23.5%,尿嘧啶(U)为 26.4%,胞嘧啶(C)为 18.6%,鸟嘌呤(G)为 31.5%(图 1)。

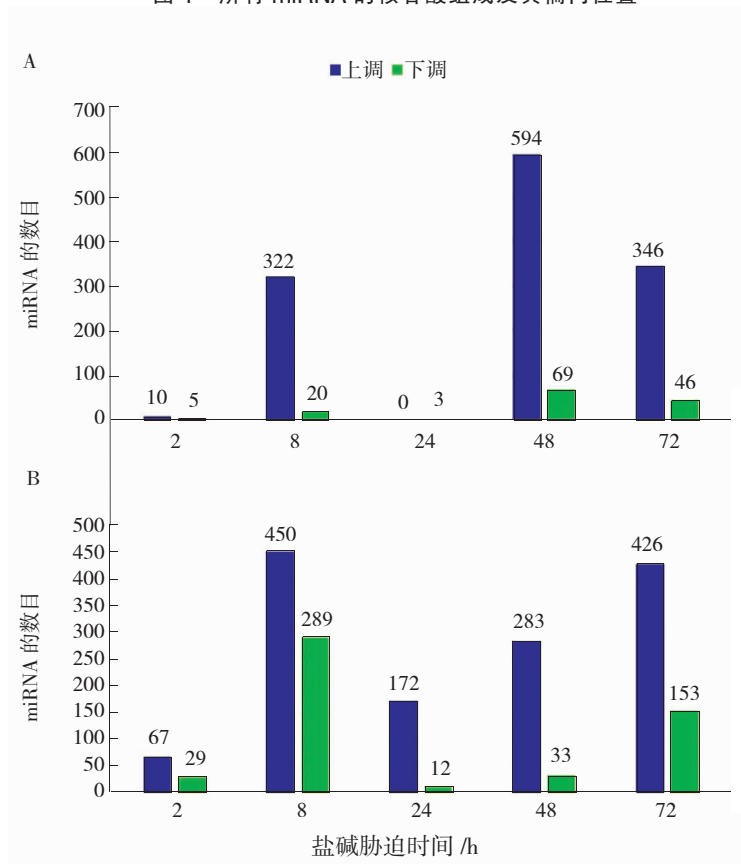
2.3 盐碱处理和对照青稞的 miRNA 表达模式

为了鉴定在盐碱胁迫下差异表达的 miRNA,基于归一化表达水平的统计比较,对差异表达模式进行了分析。我们通过比较盐碱处理和对照样品分析了 0226 在 5 个应激阶段(2、8、24、48 和 72 h)中的 miRNA 表达模式,发现上调和下调的显著差异表达的 miRNA 在 8 和 48 h 阶段增加,在 24 h 阶段减少(图 2-A)。对于 0119 发现了相同的表达模式(图 2-B)。



A. miRNA 序列各个位置的核苷酸组成;B. 不同长度 miRNA 的起始核苷酸的碱基比例

图 1 所有 miRNA 的核苷酸组成及其偏向位置



A. O226 的 miRNA 表达模式;B. O119 的 miRNA 表达模式

图 2 在 5 个盐胁迫时间段 (2、8、24、48、72 h) 中上调和下调的显著差异表达的 miRNA 数量

比较了 0119 和 0226 品种中差异表达的 miRNA(图 3),大多数 miRNA 在 0119 或 0226 品种

中被特异性上调或下调。

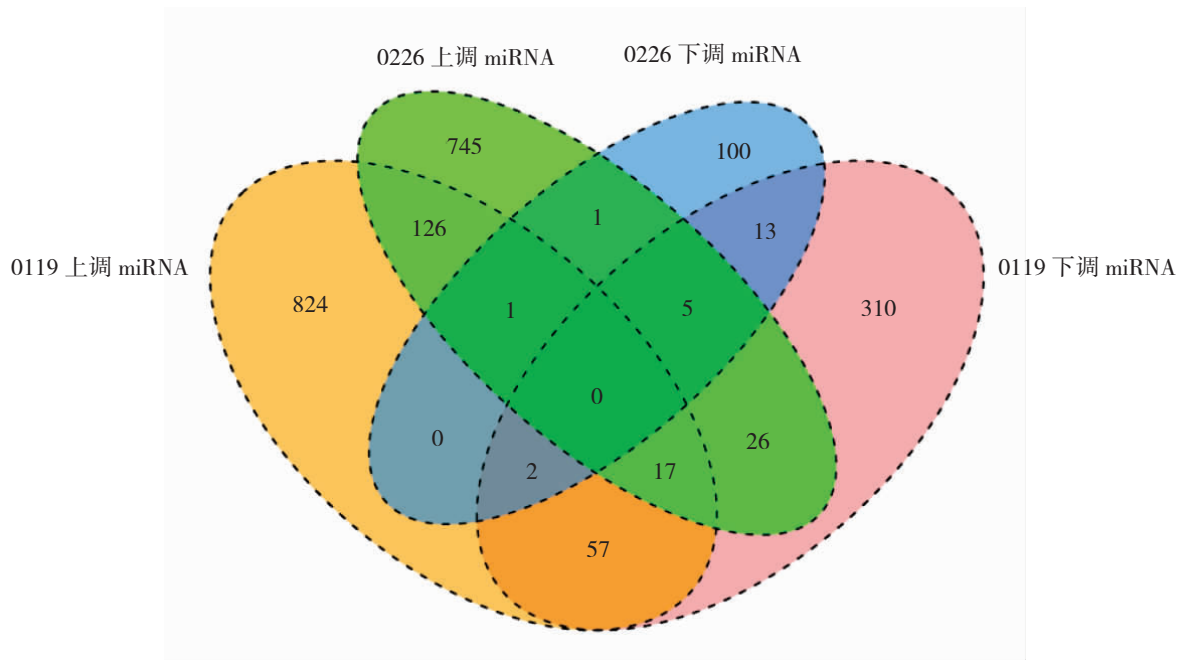


图 3 0119 和 0226 品种之间差异表达的 miRNA 的 Venn(韦恩)图

2.4 青稞 miRNA 的靶基因功能预测

miRNA 的功能通常是靶基因的转录后调控,由于与特定 mRNA 的序列互补性,导致蛋白质翻译抑制或裂解^[25],总共 363 个差异表达的 miRNA 具有潜在的靶标候选物,映射到了 Swiss Prot 数据库的靶标基因。miRNA 预测的靶标数量差异很大,范围为 1~2 107,总共为 363 个 miRNA 确定了 7 608 个唯一的目标候选物。大多数 miRNA(224 个)具有多个靶基因(2~100 个),83 个 miRNA 仅具有 1 个靶基因,56 个 miRNA 每个具有 100 多个靶基因。miRNA 及其靶基因的一些例子显示了相反的表达模式。该靶标预测分析表明,已鉴定的靶标基因调控了广泛的生物学过程。所有这些目标基因均按照基因本体(GO)数据库进行功能分类(表 1)。在细胞成分(cellular component)类别中,前 10 个 GO 类别显示大多数目标基因与膜相关(GO:0016020,GO:0016021,GO:0031224,GO:0044425 和 GO:0012505 等)。在生物过程(biological process)类别中,最富集的条目与运输相关(GO:0044765,GO:0006811,GO:0006810,GO:0006812,GO:0055085 和 GO:0030001)。在分子功能(molecular function)类别中,

转运蛋白活性(GO:0005215)、离子结合(GO:0005507 和 GO:0030001)、过氧化物酶活性(GO:0004601)、氧化还原酶活性(GO:0016684)和抗氧化活性(GO:0016209)是显著富集。分析发现,与“膜”相关的 miRNA-mRNA 调控网络中, Thb-miRn724a-3p、Thb-miRn724-1-5p 和 Thb-miRn1158-3p 位于网络的中心。KEGG 通路富集分析表明,最富集的 6 个通路展示在表 2 中,其中“植物-病原体相互作用”和“植物激素信号转导”分别富集到 248 和 149 个靶向基因。此外,靶基因 GO 富集分析显示,目标基因在 2 h 阶段显著富集了氧化还原酶活性(GO:0016682,GO:0016491 和 GO:0016679)和阳离子结合(GO:0043169)。24 h 时富集的 GO 条目是 ATP 酶活性(GO:0042623,GO:0042626 和 GO:0043492)和水解酶活性(GO:0016820)。在 48 h 的靶基因 GO 分析显示出金属簇结合(GO:0051540)、核苷酸结合(GO:0000166)和核苷三磷酸酶活性(GO:0017111)富集,而在 72 h 条件下的靶基因富集氧化还原酶活性(GO:0016682,GO:0016679 和 GO:0016491)和铜离子结合(GO:0005507)。

表1 所有盐碱反应性 miRNA 靶基因的 GO 功能分类

分类	GO 条目	功能	P 值
细胞成分 (cellular component)	GO:0016020	膜的组成	1.6 E-11
	GO:0016021	膜结构的组成	5.7 E-06
	GO:0031224	膜的结构成分的组成	5.7 E-06
	GO:0044425	膜的构成	2.4 E-05
	GO:0005783	内质网的组成	0.043
	GO:0012505	内膜系统的组成	0.047
	GO:0000502	蛋白酶复合体的组成	0.061
	GO:0005789	内质网膜的组成	0.180
	GO:0042175	核外膜 - 内质网膜网络组成	0.180
GO:0044432	内质网部分组成	0.180	
生物过程 (biological process)	GO:0044765	单一生物运输	6.6 E-09
	GO:1902578	单一生物定位	7.4 E-09
	GO:0006811	离子迁移	2.1 E-08
	GO:0006810	运输	7.7 E-07
	GO:0051234	建立生物定位	7.7 E-07
	GO:0051179	生物定位	1.3 E-06
	GO:0006812	阳离子运输	1.7 E-06
	GO:0055085	跨膜转运	6.2 E-06
	GO:0044699	单一生物过程	7.5 E-05
GO:0030001	金属离子迁移	0.000 23	
分子功能 (molecular function)	GO:0005215	转运蛋白活性	1.4 E-13
	GO:0005507	铜离子结合	9.2 E-08
	GO:0004601	过氧化物酶活性	1.4 E-07
	GO:0016684	氧化还原酶活性	1.4 E-07
	GO:0016209	抗氧化活性	1.7 E-07
	GO:0005506	铁离子结合	2.6 E-07
	GO:0046914	过渡金属离子结合	0.000 73
	GO:0008514	有机阴离子跨膜转运蛋白活性	0.000 76
	GO:0016757	转移酶活性	0.000 87
GO:0052689	羧酸酯水解酶活性	0.001 04	

注:GO 条目代表 GO 富集分析结果中不同生物学过程、细胞组分和分子功能名称的编号。

表2 所有盐碱反应性 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集类别

KEGG 通路	通路名称	基因数目
ko04626	植物 - 病原体相互作用	248
ko04075	植物激素信号转导	149
ko04121	泛素系统	148
ko03000	转录因子	137
ko00940	苯丙烷生物合成	127
ko01003	聚糖的生物合成与代谢	100

注:ko 代表 KEGG 代谢及信号通路的通路, 04626 等是在 KEGG 中的通路的编号。

3 讨论与结论

已有研究报道了对盐碱条件的两阶段生长反应^[26-27],在玉米和小麦品种中已经证实了这种两阶段生长反应^[28-30]。第一阶段主要的作用是水分胁迫或渗透作用,由于盐的积累,第二阶段的主要作用是离子性的。在本研究中,显著差异表达的 miRNA 数量在 24 h 下降。这种现象表明第一阶段可能发生在青稞用 200 mmol/L Na⁺ 培养液处理的前 24 h。GO 富集分析表明,目标基因在 2 h 阶段主要为氧化还原酶活性相关的蛋白,随后在 24、48 及 72 h,ATP 酶活性、水解酶活性、核苷酸结合及铜离子结合相关的蛋白呈现显著的表达。这些结果与先前研究报道的生理现象^[31-33]一致,这是对植物盐碱胁迫的反应。

本研究鉴定出的大部分 miRNA 是物种特异性的。在拟南芥^[9]、玉米^[11]和水稻^[34]中,已鉴定出许多与植物对盐胁迫反应相关的 miRNA。我们鉴定了 13 757 个 miRNA,其中只有 225 个在大麦中保守,2 227 个对盐碱胁迫有响应。这些 miRNA 可以与靶 mRNA 的非翻译区(UTR)或编码序列(CDS)互补结合,从而降低 mRNA 的表达水平^[1,35]。尽管表达的 miRNA 可以负调控其靶标 mRNA,但由于调控关系的复杂性,其靶标可能表现出多样化的表达模式。根据 miRNA-mRNA 调控网络的靶标基因的 GO 注释,我们推断“膜”的形成与盐碱胁迫应答有着密切的关系。在以前的研究中,为预测盐碱胁迫相关的靶标,发现许多靶标是 SPL(类表面活性物质 B 蛋白)、MYB(myb 域蛋白)、ARF(生长素应答因子)、AP2(花瓣分生组织发育蛋白 APETALA2)、NAC(NAC 结构域蛋白)和 NF-Y(核转录因子 Y)。NAC 在盐度、寒冷、ABA 和干旱胁迫下受到广泛调节^[36-38]。在这里,盐和干旱胁迫广泛调节了一个 NF-YA(核转录因子 Y 亚基 A)靶标^[39,34];确定了一组介导 ARF 调节的 miRNA,ARF 可能在植物对各种非生物胁迫(例如盐,冷和干旱胁迫)的反应中起重要作用^[40-45];还鉴定了其他基因,包括调节植物生长和发育的 SPL、MYB 和 AP2;认为许多编码重要酶和蛋白质的靶基因在盐胁迫反应中也起着重要作用。我们还发现,miRNA 交叉调控了几个靶基因,且单个 miRNA 可以调控多个靶基因。灵活的调控模式表明,这些相互作用可以调控特定发育阶段和生活环境中的特定靶标。该研究可能有助于其他作物及植物盐碱逆境应答研究方法的完善,以提高农作物适应各种

环境条件的能力。

参考文献:

- [1] GUO L,ZHAO Y,YANG S,et al. Integrative analysis of miRNA-mRNA and miRNA-miRNA interactions[J]. Biomed Research International,2014,180:907420.
- [2] CHEN X, LONG H, GAO P, et al. Transcriptome assembly and analysis of Tibetan Hulless Barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum*) developing grains, with emphasis on quality properties [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98144.
- [3] DONG Z H, SHI L, WANG Y W, et al. Identification and dynamic regulation of microRNAs involved in salt stress responses in functional soybean nodules by high-throughput sequencing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(2): 2717-2738.
- [4] WANG W X, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta, 2003, 218(1): 1-14.
- [5] BORSANI O, ZHU J H, VERSLUES P E, et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2005, 123(7): 1279-1291.
- [6] VINOCUR B, ALTMAN A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(2): 123-132.
- [7] SUNKAR R, LI Y F, JAGADEESWARAN G. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(4): 196-203.
- [8] SUNKAR R, CHINNUSAMY V, ZHU J H, et al. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(7): 301-309.
- [9] BUDAK H, KANTAR M, BULUT R, et al. Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals [J]. Plant Science, 2015, 235: 1-13.
- [10] LIU H H, TIAN X, LI Y J, et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. RNA, 2008, 14(5): 836-843.
- [11] DING D, ZHANG L F, WANG H, et al. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots[J]. Annals of Botany, 2009, 103(1): 29-38.
- [12] COVARRUBIAS A A, REYES J L. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs [J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33(4): 481-489.
- [13] LIU H P, ABLE A J, ABLE J A. SMARTER de-stressed cereal breeding[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(11): 909-925.

- [14] CAO A, JIN J, LI S Q, et al. Integrated analysis of mRNA and miRNA expression profiling in rice backcrossed progenies (BC2F12) with different plant height[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0184106.
- [15] DE MORAES L N, FERNANDEZ G J, VECHETTI-JUNIOR I J, et al. Integration of miRNA and mRNA expression profiles reveals microRNA-regulated networks during muscle wasting in cardiac cachexia[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6998.
- [16] 扎桑, 韦泽秀, 徐齐君, 等. NaHCO₃ 胁迫处理对青稞幼苗生长和生理特性的影响[J]. *大麦与谷类科学*, 2017, 34(6): 14–21.
- [17] WANG Y Q, SONG F H, ZHU J W, et al. GSA: genome sequence archive [J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2017, 15(1): 14–18.
- [18] ZENG X, LONG H, WANG Z, et al. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(4): 1095–1100.
- [19] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [20] GRIFFITHS-JONES S, MOXON S, MARSHALL M, et al. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(s1): 121–124.
- [21] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): D68–D73.
- [22] MICHAEL L, WOLFGANG H, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2015, 15: 550.
- [23] SMOOT M E, ONO K, RUSCHEINSKI J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431–432.
- [24] ALEXA A, RAHNENFU HRER J. Gene set enrichment analysis with topGO[J]. *Encyclopedia of Systems Biology*, 2007, 23: 193–205.
- [25] SCHWAB R, PALATNIK J F, RIESTER M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. *Developmental Cell*, 2005, 8(4): 517–527.
- [26] MUNGS R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses[J]. *Plant Cell and Environment*, 1993, 16: 15–24.
- [27] MUNGS R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. *Plant Cell and Environment*, 2002, 25(2): 239–250.
- [28] CRAMER G R, ALBERICO G J, SCHMIDT C. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1994, 21(5): 675–692.
- [29] FORTMEIER R, SCHUBERT S. Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion[J]. *Plant Cell and Environment*, 1995, 18(9): 1041–1047.
- [30] MUNNS R, SCHACHTMAN D P, CONDON A G, et al. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995, 22(4): 561–569.
- [31] ADAMS P, THOMAS J C, VERNON D M, et al. Distinct cellular and organismic responses to salt stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1993, 33(8): 1215.
- [32] GONG B, WEN D, BLOSZIES S, et al. Comparative effects of NaCl and NaHCO₃ stresses on respiratory metabolism, antioxidant system, nutritional status, and organic acid metabolism in tomato roots[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(8): 2167–2181.
- [33] RANGANI J, PARIDA A K, PANDA A, et al. Coordinated changes in antioxidative enzymes protect the photosynthetic machinery from salinity induced oxidative damage and confer salt tolerance in an extreme halophyte *Salvadora persica* L.[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 50.
- [34] ZHAO B T, GE L F, LIANG R Q, et al. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 29.
- [35] SOH J, IQBAL J, QUEIROZ J, et al. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19: 892–900.
- [36] FANG Y J, YOU J, XIE K B, et al. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 280(6): 547–563.
- [37] FUJITA M, FUJITA Y, MARUYAMA K, et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(6): 863–876.
- [38] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, et al. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(6): 369–381.
- [39] STEPHENSON T J, MCINTYRE C L, COLLET C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65: 77–92.
- [40] VAHAP E, UFUK C A, ESMA O, et al. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50298.

- [41] REN Y Y, CHEN L, ZHANG Y Y, et al. Identification and characterization of salt-responsive microRNAs in *Populus tomentosa* by high-throughput sequencing [J]. *Biochimie*, 2013, 95(4): 743–750.
- [42] ZHANG X N, LI X, LI J H. Identification of conserved and novel cold-responsive microRNAs in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) using high-throughput sequencing [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32: 328–341.
- [43] LIU H P, SEARLE I R, WATSON-HAIGH N S, et al. Genome-wide identification of microRNAs in leaves and the developing head of four durum genotypes during water deficit stress [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142799.
- [44] LIU H P, ABLE A J, ABLE J A. Genotypic water-deficit stress responses in durum wheat: association between physiological traits, microRNA regulatory modules and yield components [J]. *Functional Plant Biology*, 2016, 44(5): 538–551.
- [45] LIU H P, ABLE A J, ABLE J A. Water-deficit stress-responsive microRNAs and their targets in four durum wheat genotypes [J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2017, 17: 237–251.

MicroRNA-mediated Membrane System and Ion Transport are Involved in the Response to Saline-alkali Stress in Tibetan Hulless Barley

WANG Yu-lin, YUAN Hong-jun, ZHA Sang, YANG Chun-bao, XU Qi-jun

(State Key Laboratory of Hulless Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement & Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences/Institute of Agricultural Research, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850002, China)

Abstract: Saline-alkali stress is one of the most serious abiotic stresses that affect crop growth and production. Cultivated in the Tibetan Plateau, Qingke, also called Tibetan hulless barley, adapts well to extreme environmental conditions. Therefore, research on miRNA regulatory network in Qingke under saline-alkali stress can pave the way for elucidation of plant response to abiotic stresses. The present study investigated the miRNA-mediated response to saline-alkali stress in Qingke. By using high-throughput sequencing, 13,757 miRNAs were identified, of which 225 were found to be conserved in *Hordeum vulgare*. The potential target genes of the saline-alkali responsive miRNAs are predicted to be involved in membrane-related and ion transport pathways. These results suggest that membrane formation and ion transport play important roles in Tibetan hulless barley in response to saline-alkali stress.

Key Words: miRNA; Tibetan hulless barley; Saline-alkali stress

欢迎订阅 2021 年《大麦与谷类科学》

《大麦与谷类科学》是《中国期刊全文数据库》《中文科技期刊数据库》《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录期刊、超星期刊出版平台全文收录期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》统计源期刊、国家科技学术期刊开放平台全文收录期刊、国家新闻出版广电总局首次认定 A 类学术期刊。

《大麦与谷类科学》由江苏省农业科学院主管、江苏沿海地区农业科学研究所主办,是中国作物学会大麦专业委员会与江苏省农学会学术性期刊,内容具有创新性、应用性、系统性、导向性,主要报道大麦、小麦、水稻、玉米、高粱、谷子等谷类作物的研究动态和科研成果,内设栏目有:综述报告(专家视点)、生理与生态、栽培与育种、土肥与植保、贮藏与加工、资源与环境、品种介绍、现代大农业、简讯与信息、人物介绍等。主要作者与读者为:从事农业科研与农技推广的科技人员、农业企业经营管理人员、农业大中专院校师生等。

本刊为双月刊,大 16 开本。国内外公开发行,国内统一刊号 CN32-1769/S,国际刊号 ISSN 1673-6486。国内每期定价 15.00 元,全年 6 期共 90 元,自办发行。

欢迎赐稿,欢迎订阅。可随时直接与本编辑部联系。

电 话: 0515-88330625

电子信箱: damkx@163.com

邮局汇款:《大麦与谷类科学》杂志编辑部

银行汇款:江苏沿海地区农业科学研究所

账 号: 400901040004637

网 址: <http://dmkx.cbpt.cnki.net>

邮 编: 224002

地 址: 江苏省盐城市开放大道北路 9 号

开户行: 盐城市农行建中支行

用 途: 订阅费或编审费