

中南林业科技大学学报

Journal of Central South University of Forestry & Technology

ISSN 1673-923X，CN 43-1470/S

《中南林业科技大学学报》2026年第7期

Doi:10.14067/j.cnki.1673-923X.2026.07.020

论文标题： 毛竹phe-novel-miR276的克隆和功能分析

作　　者： 韩 莉，高圆梦，林小芳，等

收稿日期： 2025-07-31

引文格式： 韩莉,高圆梦,林小芳,等.毛竹phe-novel-miR276的克隆和功能分析[J].中南林业科技大学学报,2026,46(7):216-224.

Han L, Gao Y M, Lin X F, et al. Cloning and functional analysis of phe-novel-miR276 in *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2026, 46(7):216-224.

相关论文推荐

Recommended articles

干旱胁迫下毛竹细胞壁形成相关miRNAs鉴定及差异分析

Identification and differential analysis of miRNAs associated with cell wall formation in *Phyllostachys edulis* under drought stress

毛竹种子发育过程中形态和生理特性变化

Changes in morphological and physiological characteristics of *Phyllostachys edulis* seeds during development

带状采伐对毛竹生物量和根系非结构性碳水化合物的影响

Effects of strip logging on the biomass and root non-structural carbohydrates of *Phyllostachys edulis*

不同钾水平对毛竹幼苗生长及生理指标的影响

Effects of different potassium levels on seedling growth and physiological indexes of *Phyllostachys edulis*

干旱对不同年龄毛竹光合作用日变化及环境因子的影响

Impact of drought on the diurnal variation of photosynthesis and environmental factors in *Phyllostachys edulis* leaves of different ages

不同经营方式下毛竹林物种多样性及碳汇功能差异性

Differences of species diversity and carbon sink capacity of moso bamboo forest under different management modes

Doi:10.14067/j.cnki.1673-923x.2026.07.020 http: //qks.csuft.edu.cn

毛竹 phe-novel-miR276 的克隆和功能分析

韩 莉，高圆梦，林小芳，李 英，李雪平

（国际竹藤中心 竹藤国家林业和草原局重点实验室，北京 100102）

摘 要：【目的】探究毛竹新 miRNA phe-novel-miR276 对木质素合成的调控作用，为毛竹材质改良与分子育种提供理论参考。【方法】采用生物信息学方法分析前期筛选获得的毛竹差异表达的新 miRNA（phe-novel-miR276）；通过 qRT-PCR 检测其在毛竹不同组织中的表达模式，计算相对表达量并进行差异分析；克隆 phe-novel-miR276，构建过表达植物表达载体，经农杆菌介导转化水稻并筛选阳性转基因株系；测定转基因水稻与野生型水稻的木质素含量及 POD、SOD 活性，对比分析各项指标的组间差异。【结果】1）序列分析表明，phe-novel-miR276 与 miR398 家族具有高度同源性，推测其为 miR398 家族的新成员；2）phe-novel-miR276 在毛竹根、茎和叶中均有表达，且根部相对表达量最高；3）间苯三酚染色显示转基因株系茎、叶木质素染色深度变浅，微量法测定木质素含量的结果表明其茎、叶木质素总含量显著降低；4）qRT-PCR 检测显示，与野生型水稻相比，转基因株系中 phe-novel-miR276 的水稻同源靶基因 *Os10g36848*（编码 F5H）表达量显著下调。此外，转基因株系 POD 和 SOD 活性分别显著高于野生型。【结论】在毛竹中，phe-novel-miR276 可通过下调靶向调控木质素合成相关基因的表达发挥调控作用，并间接影响植株抗氧化酶系统活性。

关键词：毛竹；phe-novel-miR276；基因表达模式；功能分析

中图分类号：S718.46 **文献标志码：**A **文章编号：**1673-923X(2026)07-0216-09

Cloning and functional analysis of phe-novel-miR276 in *Phyllostachys edulis*

Han Li, Gao Yuanmeng, Lin Xiaofang, Li Ying, Li Xueping

(Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Bamboo & Rattan,
International Centre for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract:【Objective】To explore the regulatory effect of novel miRNA phe-novel-miR276 on lignin synthesis in moso bamboo, so as to provide theoretical reference for material quality improvement and molecular breeding of moso bamboo.【Method】Using bioinformatics methods, we analyzed the novel differentially expressed miRNA (phe-novel-miR276) screened in the preliminary study of moso bamboo. qRT-PCR was applied to detect its expression patterns in different moso bamboo tissues, followed by calculation of relative expression levels and differential analysis. The phe-novel-miR276 was cloned to construct an overexpression plant vector, which was transformed into rice via Agrobacterium mediation for screening positive transgenic lines. Lignin content as well as POD and SOD activities of transgenic and wild-type rice were determined, and intergroup differences of each index were compared and analyzed.【Result】1) Sequence analysis revealed that phe-novel-miR276 shares high homology with the miR398 family, suggesting it is a new member of the miR398 family; 2) phe-novel-miR276 is expressed in the roots, stems, and leaves of *P. edulis*, with the highest relative expression level in the roots; 3) Phloroglucinol staining showed that the lignin staining depth in the stems and leaves of transgenic lines was lighter; meanwhile, the results of the microdetermination method indicated that the total lignin content in the stems and leaves of transgenic lines was significantly reduced; 4) qRT-PCR detection demonstrated that, compared with wild-type rice, the expression level of *Os10g36848*-the rice homologous target gene of phe-novel-miR276 (encoding ferulate 5-hydroxylase, F5H)-was significantly downregulated in transgenic lines. Additionally, the POD and SOD activities in transgenic lines were significantly higher than those in wild-type rice, respectively.【Conclusion】In *P. edulis*, phe-novel-miR276 exerts its regulatory role by downregulating the expression of lignin biosynthesis-related target genes, and indirectly affects the activity of the antioxidant enzyme system in plants.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; phe-novel-miR276; gene expression pattern; functional analysis

收稿日期（Received）：2025-07-31 **修订日期**（Revised）：2025-10-20

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFD2200504_4）。

第一作者：韩莉（hanlii1211@163.com），硕士研究生。 **通信作者：**李雪平（lxp@icbr.ac.cn），研究员，硕士研究生导师。

引文格式：韩莉 , 高圆梦 , 林小芳 , 等 . 毛竹 phe-novel-miR276 的克隆和功能分析 [J]. 中南林业科技大学学报 ,2026,46(7):216-224.

Han L, Gao Y M, Lin X F, et al. Cloning and functional analysis of phe-novel-miR276 in *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2026,46(7):216-224.

毛竹 *Phyllostachys edulis* 作为禾本科 Poaceae 刚竹属 *Phyllostachys* 植物，是我国栽培面积最广、具有重要经济价值的笋材两用竹种 [1-2]。对于毛竹而言，细胞壁的结构特性是其生长发育与环境适应的关键基础 [3-4]，其中木质素的组成特征及动态积累过程不仅直接决定竹材的机械强度与理化特性 [5]，更在植株响应干旱胁迫的生理过程中发挥核心作用 [6]。已有研究证实，干旱条件下植物可通过促进木质素沉积实现细胞壁致密化，这一过程能有效增强细胞水分保持能力，减少水分散失，进而提升植株抗旱性 [7-8]。

近年来研究发现，microRNA（miRNA）作为转录后调控的关键因子，可通过剪切靶 mRNA 或抑制其翻译，在调控植物细胞壁建成与逆境应答中发挥核心作用。例如，在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中，miR165、miR166 参与调控木质部发育以响应水分胁迫 [9]；水稻中 OsmiR398 通过调控抗氧化代谢正向调控抗旱耐逆性 [10]；玉米 *Zea mays* L. 中 miR156 则通过调控 SPL 转录因子平衡生长与抗旱响应 [11]。这些研究表明，miRNA 可能通过调控细胞壁成分（如木质素）的合成，参与植物的干旱适应过程。

本研究前期通过高通量测序鉴定出 1 个在毛竹不同梯度干旱处理下差异表达的新 miRNA（phe-novel-miR276），并通过双荧光素酶验证其靶向切割编码木质素合成关键酶 F5H（阿魏酸 -5- 羟化酶，Ferulate 5-Hydroxylase）的基因 *PH02Gene36673* 和 *PH02Gene36674*[8]。为了进一步明确其在毛竹中的生物学功能和调控机制，本研究将对其进行序列及表达分析、转基因水稻性状分析等，旨在明确 phe-novel-miR276 在毛竹木质素生物合成中可能的调控作用。

1　材料与方法

1.1　材　料

2022 年 9 月，在广西壮族自治区（20°54′ ～ 26°23′N，104°26′ ～ 112°03′E）采集毛竹种子。该采集地属亚热带季风气候，温暖湿润，降水丰沛且雨热同期。将毛竹种子浸泡在清水中 2 ～ 3 d，播种于含有腐殖质土和蛭石（体积比为 7 ∶ 3）的塑料盆中，置于培养箱（25 ℃光照 16 h；18 ℃黑暗 8 h）中培养。待毛竹幼苗生长至 3 叶 1 心期时（培养第 30 天），分别收集毛竹约 2 cm 根部和 2 cm 茎部小段以及所有叶片；用超纯水冲洗表面，擦干水分后迅速浸入液氮冷却；充分脱水后收集在 RNase-free 酶的离心管中，保存于 −80 ℃冰箱备用。

1.2　phe-novel-miR276 筛选及序列分析

基于中国国家基因组科学数据中心组学原始数据归档库（GSA:CRA015504，https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa/browse/CRA015504）已发布的干旱胁迫下毛竹 small RNA 测序数据，本研究从中筛选得到干旱胁迫不同时间点差异表达的新 miRNA（phe-novel-miR276），并将其作为后续研究的核心对象。利用 miRDeep2 v2.0.5 软件对 miR276 前体序列进行二级结构预测。从 miRBase 数据库（http://www.mirbase.org）下载水稻和拟南芥的 miR398 家族基因序列，借助 MEGA 11 软件中的 Clustalw 程序，在默认参数条件下与 phe-novel-miR276 的成熟序列和前体序列进行多重序列比对，并采用 GENEDOC v2.7 软件将对比结果进行可视化，以揭示其序列保守特征并初步推测其潜在生物学功能。

1.3　基于 qRT-PCR 的 phe-novel-miR276 在毛竹不同组织中的表达量分析

使用总 RNA 快速提取试剂盒（简石生物技术有限公司，北京）分别提取毛竹根部、茎部和叶片的总 RNA。利用 DesignV 1.01 软件，根据 miRNA 成熟体序列设计反转录茎环引物、正向引物及反向通用引物（表 1）；并采用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）进行反转录试验。以 *U6* 作为 miRNA 内参基因 [8]，使用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）进行实时荧光定量分析，以探究 phe-novel-miR276 在毛竹不同组织中的表达量。试验设置 3 次技术重复，采用单因素分析法进行数据统计分析。

1.4　phe-novel-miR276 过表达载体构建

以毛竹 cDNA 为模板，克隆得到 phe-novel-miR276 目的片段，并在片段两端分别引入 *Xba* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ酶切位点序列。使用 *Xba* Ⅰ酶和 *Kpn* Ⅰ酶对 pCAMBIAsuper1300-GFP 载体进行双酶切，将线性化载体与目的插入片段按照 1∶2 摩尔比进行重组反应。将重组产物转化到 Trans 5α 感受态细胞中，并进行测序和酶切双重验证。利用冻融法将上述构建成功的过表达载体转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 中，通过卡那霉素、利福平抗性筛选结合 PCR 检测进行阳性菌株鉴定，筛选获得阳性农杆菌菌液并低温保存备用。

表 1 本研究所用引物信息
Table 1 Information for the primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′ → 3′）Primer sequence (5′ → 3′)	用途 Applications
Stem-loop-miR276-F	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGGG	反转录
miR276-F	CGCGTGTGTTCTCAGGTCG	RT-qPCR
miR276-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	RT-qPCR
U6-F	GGACATCCGATAAAATTGGAACGATACAG	RT-qPCR
U6-R	AATTTGGACCATTTCTCGATTTATGCGTGT	RT-qPCR
OE-miR276-F	atacaccaaatcgactctagaGTTGGTGGCGAGGAGGCT	载体构建
OE-miR276-R	gcccttgctcaccatggtaccGTACAATCTCAACCATGAGTTAAGCC	载体构建
Os10g36848-F	ACCATGGAGTGGCTTCAGGA	RT-qPCR
Os10g36848-R	TGCGTCAGCTGGTCCATCAT	RT-qPCR
Actin-F	ACTTCCTCATGCTATTCTTCGGTT	RT-qPCR
Actin-R	GGCAACTCATAGCTCTTCTCAACA	RT-qPCR

1.5 功能验证载体的构建与鉴定

1.5.1 水稻遗传转化

采用农杆菌介导的遗传转化法，将构建好的 phe-novel-miR276 过表达载体导入野生型水稻（由武汉伯远生物科技有限公司提供）。具体步骤如下：将消毒后的水稻种子接种于诱导培养基上培养 20 d，获得长势良好的愈伤组织；随后用 OD_{600} 值为 0.2 的农杆菌重悬液侵染愈伤组织 15 min，置于共培养基上暗培养 48 ～ 72 h；之后依次在筛选培养基、二次筛选培养基上进行抗性筛选，获得阳性抗性愈伤组织；再将阳性抗性愈伤组织转入分化培养基中培养 15 ～ 20 d，待幼苗分化成型后，转入生根培养基诱导生根。当幼苗株高长至 2 ～ 5 cm 时，于 30 ℃光照条件下炼苗 7 ～ 10 d；炼苗结束后移栽至培养盒中常规培养。

1.5.2 转基因阳性水稻植株的筛选与分子验证

水稻幼苗移栽至培养盒生长约 4 周后，随机选取 11 株再生植株并做好标记。采集植株叶片样品，提取叶片基因组 DNA，采用载体特异性引物进行聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction，即 PCR 扩增），并经琼脂糖凝胶电泳分离。选取电泳条带位置与预期相符的植株 PCR 产物，进行 Sanger 测序及序列比对分析，筛选并标记序列比对正确的阳性株系，供后续基因功能分析。

1.6 转基因水稻生理生化特征及分子表达

1.6.1 木质素分布与含量检测

试验材料为经 PCR 及测序鉴定的 phe-novel-miR276 过表达转基因水稻阳性株系与野生型株系。植株置于光照强度约 4 000 lx、昼温 30 ℃、夜温 23 ℃，光暗时长各 12 h 的培养室中培养至完熟期（播种后约 120 d）。取样时，从各转基因株系及野生型株系中随机选 3 株长势一致、无病虫害植株作为生物学重复；每株分别截取倒数第 2 节间茎段 2 cm（去除叶鞘分蘖芽，洗净吸干），与对应叶片中部 1 cm×1 cm 组织块（洗净吸干）；每份样品均分为 2 份备用。

对水稻叶片和茎部木质部进行间苯三酚染色，具体步骤如下：首先进行切片脱塑与梯度复水处理，将切片依次放入乙二醇、乙醚、乙酸酯Ⅰ溶液中，37 ℃处理 6 h，再转入乙二醇、乙醚、乙酸酯Ⅱ溶液中，37 ℃避光过夜；随后于室温下，依次经乙二醇、乙醚、乙酸酯Ⅲ和乙酸酯Ⅳ溶液各处理 10 ～ 15 min，再经 100% 乙醇、100% 乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇各脱水复水处理 10 min，最后用自来水冲洗。媒染时，将切片放入间苯三酚染液 C 中媒染 5 s，水洗后晾干。正式染色操作如下：先用组化笔圈住组织区域，以巴氏滴管滴加适量间苯三酚染液 B 覆盖组织，染色 30 s；随即用干净吸管滴加等体积间苯三酚染液 A 并吹打液面混匀，继续染色 2 min。封片拍照时，用吸管吸去多余染液后直接用盖玻片封片，并需在 3 min 内完成观察和拍照；因染色容易褪色，需尽快记录结果。

利用微量法测定水稻茎部和叶片混样木质素含量，具体步骤如下：先将样品于 80 ℃烘干至恒定质量，粉碎后过 0.425 mm 孔径筛；均匀混合后称取 3 mg 样品置于 1.5 mL 离心管中；接着将分光光度计预热 30 min 以上，波长调至 280 nm，用冰乙酸调零；在 1.5 mL 玻璃管中按操作表 [12] 依次加入试剂，于 280 nm 处分别测定测定管吸光度（$A_{测定管}$）、空白管吸光度（$A_{空白管}$）、标准管吸光度（$A_{标准管}$），并计算吸光度差值（A）、标准吸光度差值（$A_{标准}$）和木质素含量（ω）。

$A=A_{测定管}-A_{空白管}$。　（1）

$A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}$。　（2）

$\omega=0.599\ 8\times A\div A_{标准}\div m$。　（3）

式中：m 为样本质量。

1.6.2　靶基因同源基因表达水平检测

利用 Phytozome 网站（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search）筛选在水稻中 phe-novel-miR276 靶基因的同源基因。以 *Actin* 作为内参基因[13]，使用 Primer Premier 5 软件设计内参基因和同源基因的定量引物（表 1）。使用总 RNA 快速提取试剂盒分别提取过表达 phe-novel-miR276 转基因水稻和野生型水稻的总 RNA；按照反转录试剂盒（北京兰博利德商贸有限公司，北京）说明书进行反转录试验，得到 cDNA。最后，以 cDNA 为模板，使用 SYBR Green qPCR 试剂盒（中科瑞泰生物科技有限公司，北京），按照荧光定量仪标准程序进行 qPCR 检测。试验设置 3 次技术重复，采用单因素分析法进行数据统计。

1.6.3　POD 和 SOD 活性的测定

试验材料为经 PCR 扩增以及测序鉴定的转基因水稻阳性株系及野生型株系。所有材料均放入光照约 4 000 lx、昼温 30 ℃、夜温 23 ℃，光暗周期各 12 h 的培养室中，培养至完熟期（播种后约 120 d）。取样时，采集其叶片和茎部，切小段加入液氮速冻后 −80 ℃下保存。测定时，按照过氧化物酶（Peroxidase，POD）检测试剂盒和超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，北京）说明书进行操作。具体操作如下：将叶片和茎部混合，置于液氮中充分研磨至粉末；取 0.1 g 研磨粉末，加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆，于 4 ℃、8 000×g 条件下离心 10 min，取上清液作为酶粗提液；接着将分光光度计预热 30 min 以上，以蒸馏水校准调零，分别在 470 nm 波长下测定 POD 吸光度、560 nm 波长下测定 SOD 吸光度，并计算酶活性。试验设置 3 次技术重复，采用单因素分析法进行数据统计。

2　结果与分析

2.1　phe-novel-miR276 的鉴定与分析

phe-novel-miR276 的前体序列位于 hic_scaffold_10 染色体上，能够形成稳定的发夹结构（图 1），并且最小折叠自由能（Minimum free energy，MFE）小于 −410.87 kJ/mol，符合 miRNA 特征性 MFE 阈值（通常小于 −75.3 kJ/mol）。

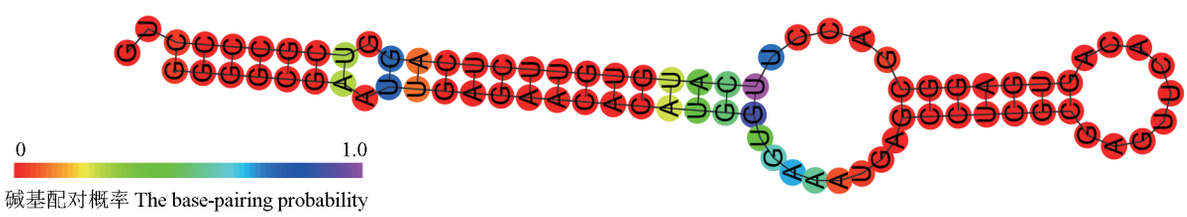


图 1　phe-novel-miR276 前体二级茎环结构的预测

Fig. 1　Structural prediction of the secondary stem-loop of the phe-novel-miR276 precursor

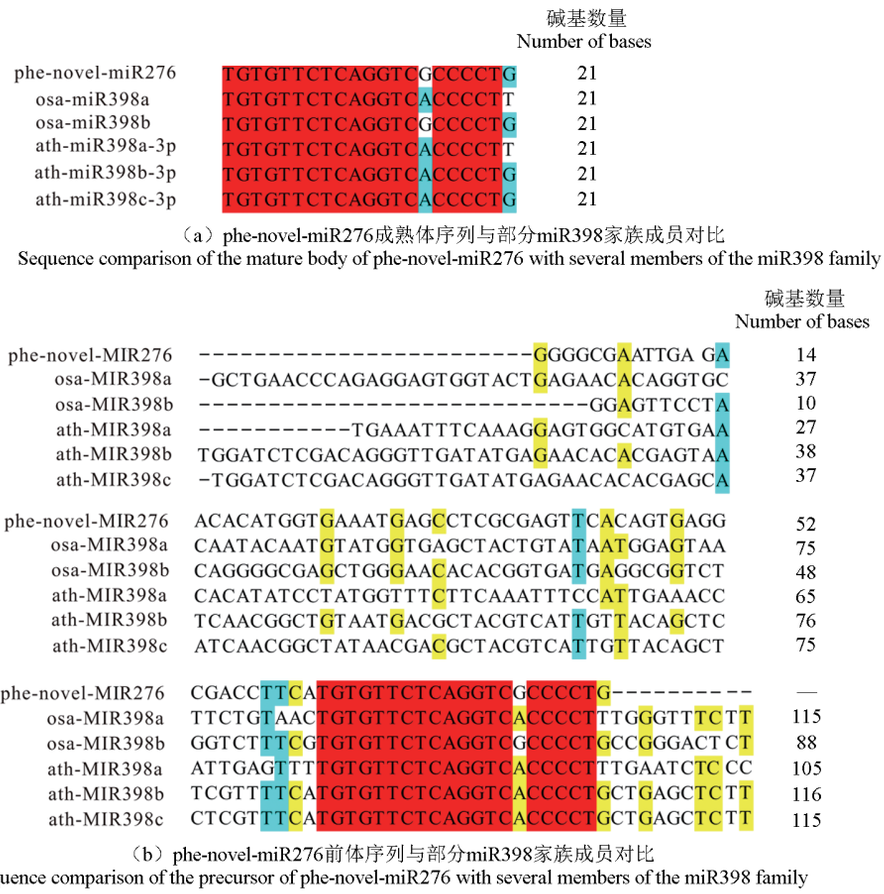
phe-novel-miR276 的成熟序列与 miR398 家族同源性很高（图 2a），与 osa-miR398a、osa-miR398b 和 ath-miR398a-3p、ath-miR398b-3p 均只相差 2 个碱基。此外，phe-novel-miR276 与 osa-miR398a、osa-miR398b 和 ath-miR398a-3p、ath-miR398b-3p 家族均分别位于各自前体序列的 3′ 端（图 2b）。

2.2　phe-novel-miR276 在毛竹不同组织的表达分析

RT-qPCR 结果表明（图 3），phe-novel-miR276 在毛竹不同组织中均有表达，且呈现显著的组织特异性表达模式。其中，该 miRNA 在根部的表达量最高，茎部表达量次之，叶片中的表达量最低且显著低于根部和茎部。从差异显著性来看，根部与茎部的表达水平差异未达到显著水平，但二者均显著高于叶片，说明 phe-novel-miR276 主要在地下及茎干组织中发挥功能，在叶片中可能仅维持较低水平的基础表达。

2.3　phe-novel-miR276 过表达载体的构建及转基因水稻阳性植株的检验

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示（图 4），扩增产物条带清晰、单一，无明显非特异性扩增及拖尾现象，条带大小与理论预期一致，证实目的片段已成功插入表达载体，phe-novel-miR276 过表达载体构建成功，可用于后续的水稻遗传转化试验。

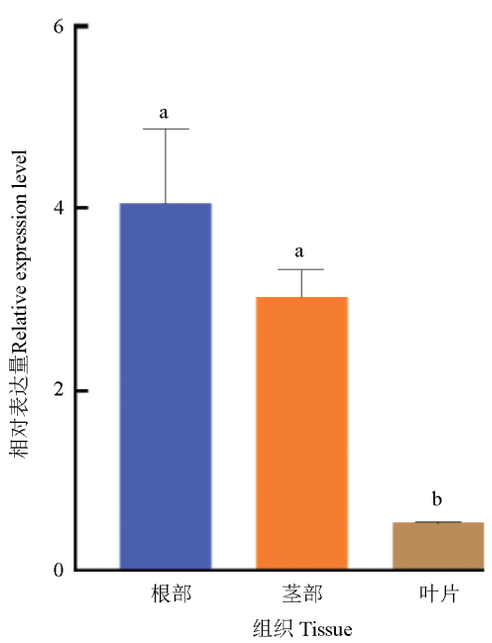


（a）phe-novel-miR276成熟体序列与部分miR398家族成员对比
Sequence comparison of the mature body of phe-novel-miR276 with several members of the miR398 family

（b）phe-novel-miR276前体序列与部分miR398家族成员对比
Sequence comparison of the precursor of phe-novel-miR276 with several members of the miR398 family

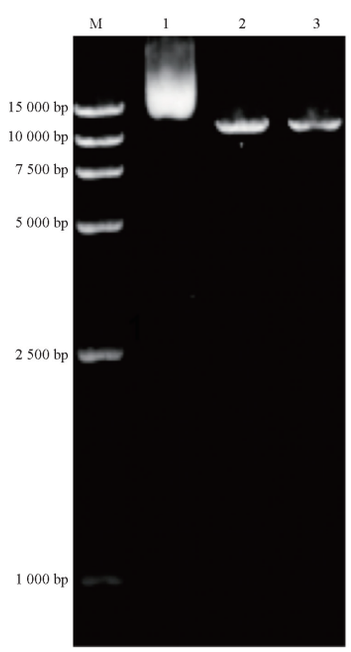
物种前缀“ath-”和“osa-”分别代表拟南芥和水稻。“—”代表碱基空位。红色代表保守核心区，黄色代表部分保守且对基因功能具有重要作用的碱基位点，蓝色代表序列差异位点。
The prefixes “ath-” and “osa-” denote sequences from Arabidopsis thaliana and Oryza sativa, respec-tively. “—” indicates base gaps. Red indicates the conserved core region, yellow represents partially conserved/functionally important nucleotide sites, and blue denotes sequence variation sites.

图 2　phe-novel-miR276 与 miR398 家族成员成熟 miRNA 及前体 miRNA 的序列比对
Fig. 2　Sequence comparison of phe-novel-miR276 with mature miRNAs and precursor miRNA of miR398 family members



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level.

图 3　毛竹不同组织中 phe-novel-miR276 的表达分析
Fig. 3　Analysis of phe-novel-miR276 expression in different tissues of moso bamboo



M. DL 15 000 DNA 分子量标准；1. pCAMBIAsuper1300-GFP 质粒；2 ～ 3. *Xba* Ⅰ *-Kpn* Ⅰ双酶切线性化产物。
M. DL 15 000 DNA Marker; 1. plasmid pCAMBIAsuper1300-GFP; 2-3. *Xba* Ⅰ *-Kpn* Ⅰ dual-enzyme-mediated linearization.

图 4　pCAMBIAsuper1300-GFP 双酶切及电泳检测
Fig. 4　Double enzyme digestion and electrophoresis analysis of pCAMBIAsuper1300-GFP

随后，对获得的 11 株再生植株进行 PCR 分子鉴定。电泳结果显示（图 5），8 株可扩增出与预期大小相符的特异性条带，其余 3 株未检测到目的片段条带，初步判定为阴性植株。据此计算，本次转化的阳性植株率为 72.7%，表明遗传转化体系稳定有效，获得的阳性植株可作为后续功能验证的材料。

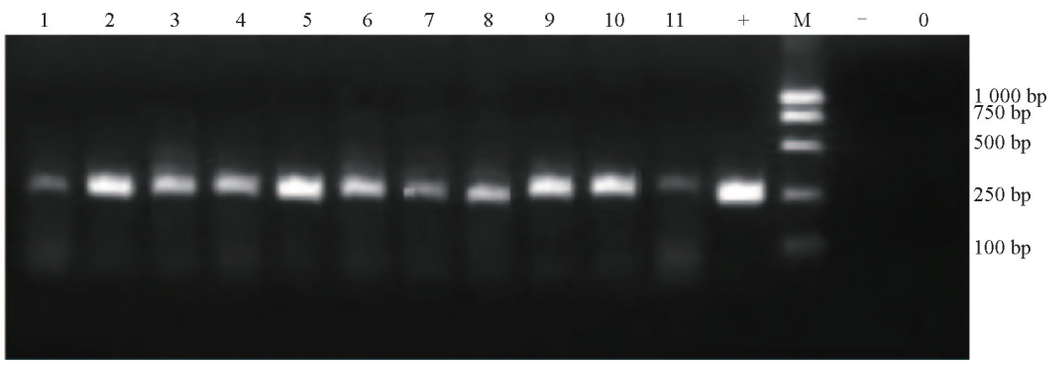
2.4　转基因水稻生理生化特征及分子表达分析

2.4.1　木质素含量分析

间苯三酚染色结果显示，转基因水稻株系茎部和叶片的木质化区域红色染色面积少于野生型株系（图 6）。木质素含量检测结果显示，转 phe-novel-miR276 水稻株系茎部和叶片混样木质素含量同样低于野生型株系（图 7）。以上结果均表明，phe-novel-miR276 过表达可抑制转基因水稻株系茎、叶组织的木质素的合成与积累。

2.4.2　靶基因同源基因的表达量分析

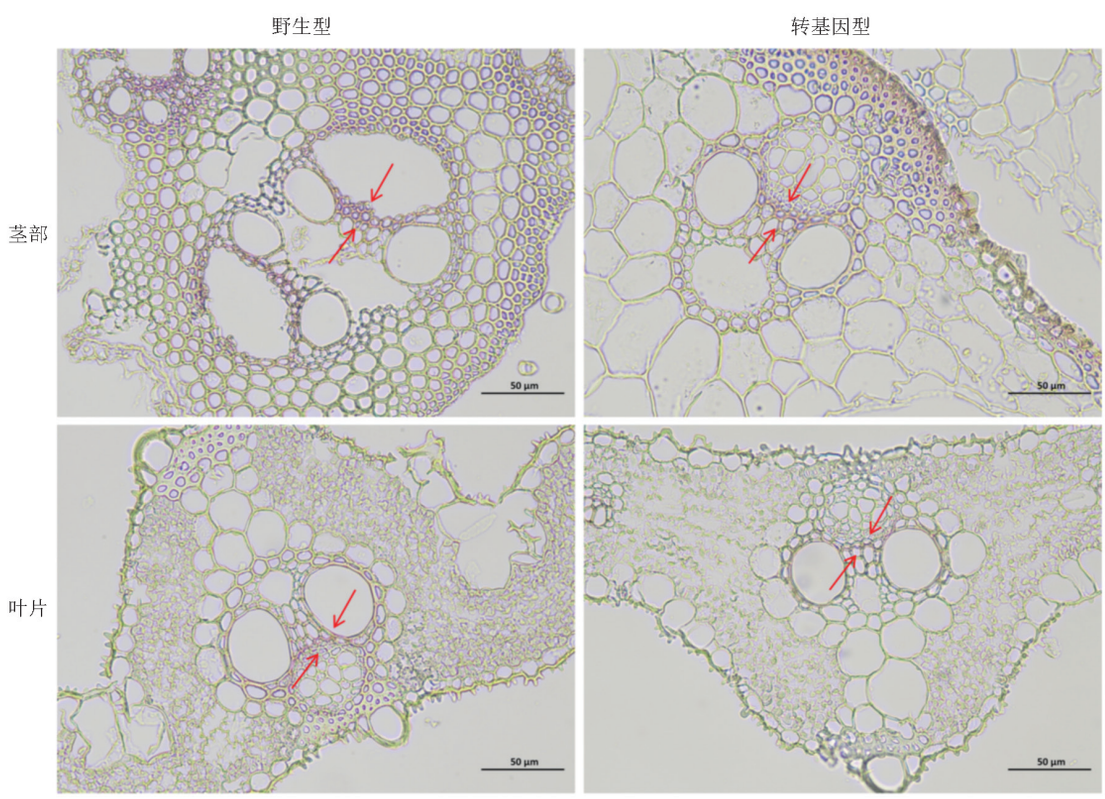
通过 Phytozome 网站筛选到与毛竹 phe-novel-miR276 靶基因 *PH02Gene36673* 和 *PH02Gene36674*（已通过双荧光素酶试验验证）同源性最高的水稻基因为 *Os10g36848*。通过 RT-qPCR 分析



M. 分子量标准（1 000 bp）；+. 阳性对照；−. 阴性对照；0. 水对照；1 ～ 11. 转基因植株条带。
M. 1 000; +. positive control; −. negative control; 0. water; 1-11. bands from transgenic plants.

图 5　转 phe-novel-miR276 水稻植株的电泳鉴定

Fig. 5　Electrophoretic verification of phe-novel-miR276-transgenic positive rice plants

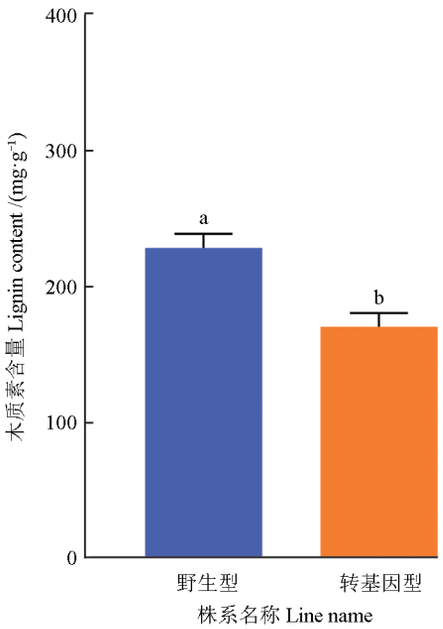


红色箭头指向木质素富集区域。The red arrow marks the lignin-enriched region.

图 6　野生型和转基因型水稻株系间苯三酚染色

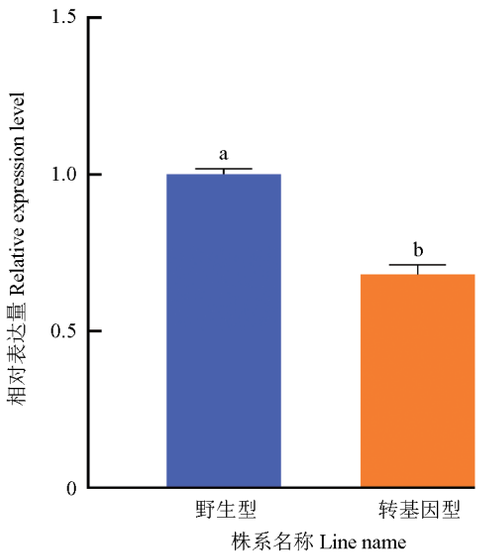
Fig. 6　Phloroglucinol staining of wild-type and transgenic rice lines

Os10g36848 在转基因株系中的表达水平。结果显示（图 8），该基因在转基因株系中的相对表达量显著降低，由此说明 phe-novel-miR276 对靶基因 *PH02Gene36673* 和 *PH02Gene36674* 可抑制其水稻同源基因 *Os10g36848* 的表达。



不同小写字母表示在 0.01 水平上差异显著（*t* 检验）。
Different lowercase letters indicate significant differences at 0.01 level (*t*-tests).

图 7　野生型和转基因型水稻株系木质素含量
Fig. 7　Lignin content in wild-type and transgenic rice lines



不同小写字母表示在 0.001 水平上差异显著（*t* 检验）。下同。
Different lowercase letters indicate significant differences at 0.001 level (*t*-tests). The same below.

图 8　*Os10g36848* 基因在野生型和转基因型水稻株系中的相对表达量
Fig. 8　Relative expression levels of *Os10g36848* gene in wild-type and transgenic rice lines

2.5　POD 与 SOD 活性分析

酶活性测定结果显示（图 9），转基因株系 POD 和 SOD 活性均显著高于野生型株系，表明 phe-novel-miR276 的过表达可显著提升转基因水稻叶片的抗氧化酶（POD、SOD）活性。

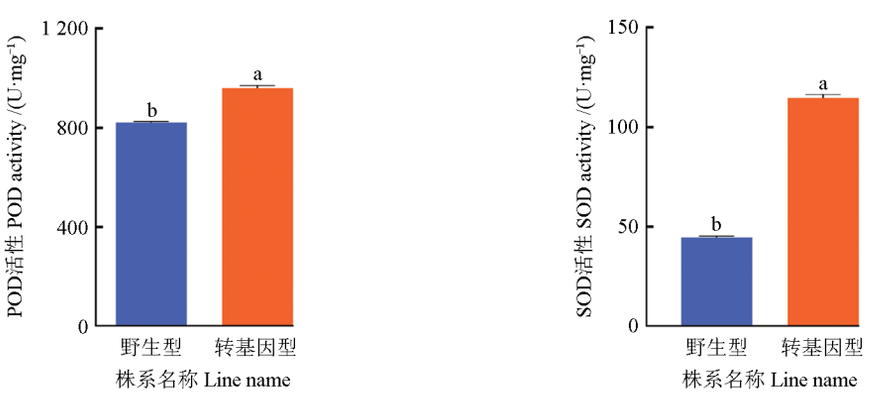


图 9　野生型和转基因型水稻株系 POD 和 SOD 活性的对比分析
Fig. 9　Comparative analysis of POD and SOD activities in wild-type and transgenic rice lines

3　讨　论

干旱是制约植物生长发育的主要非生物胁迫之一，其通过诱导植物细胞脱水、活性氧（Reactive oxygen species，ROS）爆发及代谢紊乱，显著影响植物生存与产量 [14-15]；而 miRNA 作为植物响应逆境的关键调控因子，可通过精准靶向胁迫相关基因，快速调控下游生理代谢通路，成为植物抵御干旱胁迫的核心分子“开关”[16]。miR398 家族可同时参与植物的“逆境响应”与“基础代谢”，因此在植物干旱响应的调控机制中受到广泛关注 [17]。相关研究表明，miR398 家族可通过靶向 Cu-SOD、Zn-SOD 和 APX 等基因调控 POD、SOD 等抗氧化酶活性，增强植物对干旱、盐害等胁迫的抗性 [18-20]；同时，该家族还能通过影响木质部细胞分化，间接调控木质素合成关键基因表达，参与细胞壁木质化进程 [21]。

本研究聚焦毛竹新发现的 miR398 家族成员 phe-novel-miR276，在水稻中验证其功能时发现，过表达该 miRNA 的转基因水稻茎秆木质素含量显著降低，且水稻中与 phe-novel-miR276 靶基因同源的 *Os10g36848* 基因（编码 F5H，木质素合成关键酶）表达显著下调，说明 phe-novel-miR276 可能通过抑制 *Os10g36848* 基因表达来减少木质素积累。该调控模式为后续解析毛竹中 phe-novel-miR276 对自身木质素代谢的调控机制提供了参考。随着木质素含量降低，过表达株系叶片中 POD、SOD 活性显著升高。结合木质素的 ROS 清除功能，推测木质素含量降低导致 ROS 积累，进而诱导植物启动抗氧化酶系统的适应性激活响应 [22]。已有研究表明，木质素具有清除 ROS 的作用 [23]。本研究结果既与 miR398 家族已知的“调控植物抗氧化系统”功能特征一致 [24]，也为“木质素缺失 -ROS 积累 - 抗氧化酶活性变化”的关联提供了试验依据。

后续研究可从以下 2 个方面对结论进行验证并进一步解析其调控机制。1）采用短串联靶标模拟技术沉默 phe-novel-miR276，系统测定沉默株系的木质素含量、抗氧化酶（POD、SOD 等）活性及干旱耐受能力，明确其在干旱胁迫中的具体功能 [25-26]。2）利用 CRISPR/Cas9 技术定点编辑毛竹 phe-novel-miR276 预测靶基因 *PH02Gene36673* 和 *PH02Gene36674*（木质素合成关键酶 F5H）的 miRNA 结合位点，阻断靶向调控互作；通过比较突变株系与野生型、转基因株系在木质素合成关键指标（如总木质素含量、紫丁香基木质素与愈创木基木质素的比值等）及干旱耐受指标（如萌发率、幼苗存活率等）差异，验证这 2 个基因在该调控通路中的核心介导作用 [27-28]。

4　结　论

本研究从毛竹中克隆鉴定出新型 miRNA（phe-novel-miR276），其具有典型 miRNA 结构且属于 miR398 家族。该 miRNA 在毛竹根、茎、叶中均有表达，且根、茎部表达量显著高于叶，暗示其可能通过调控根系相关生理过程参与毛竹对干旱胁迫的响应调控。构建 phe-novel-miR276 过表达载体并转化水稻后发现，转基因水稻茎、叶木质素含量显著降低，该 miRNA 在水稻中的同源靶基因 *Os10g36848* 表达水平下调，同时植株茎、叶 POD、SOD 活性显著升高。综上，推测毛竹 phe-novel-miR276 可能通过靶向调控木质素合成相关基因，间接影响植株抗氧化酶系统活性。

参考文献：

[1] Atanda J. Environmental impacts of bamboo as a substitute constructional material in Nigeria[J]. Case Studies in Construction Materials,2015,3:33-39.

[2] Chen Y X, Qiu K, Kuai B K, et al. Identification of an NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis* ‘Viridiflavus’)[J]. Physiologia Plantarum,2011,142:361-371.

[3] 甘小洪 , 丁雨龙 . 毛竹茎秆纤维发育过程中细胞壁的变化规律研究 [J]. 林业科学研究 ,2006,19(4):457-462.
Gan X H, Ding Y L. Investigation on the variation of fiber wall in *Phyllostachys edulis* culms[J]. Forest Research, 2006,19(4):457-462.

[4] Lin X F, Han L, Gao Y M, et al. Identification and characterization of circRNAs associated with cell wall formation in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) based on multi-omics data[J]. Industrial Crops and Products,2025,223:120240.

[5] 杨淑敏 , 刘杏娥 , 尚莉莉 , 等 . 竹材木质素特性及表征方法研究进展 [J]. 材料导报 ,2020,34(7):7177-7182.
Yang S M, Liu X E, Shang L L, et al. The characteristics and representation methods of lignin for bamboo[J]. Materials Reports,2020,34(7):7177-7182.

[6] Han X J, Zhao Y Q, Chen Y J, et al. Lignin biosynthesis and accumulation in response to abiotic stresses in woody plants[J]. Forestry Research,2022,2:9.

[7] Kang T, Yu C Y, Liu Y, et al. Subtly manipulated expression of ZmmiR156 in tobacco improves drought and salt tolerance without changing the architecture of transgenic plants[J]. Frontiers in Plant Science,2020,10:1664.

[8] 高圆梦 , 林小芳 , 杨旸 , 等 . 干旱胁迫下毛竹细胞壁形成相关 miRNAs 鉴定及差异分析 [J]. 中南林业科技大学学报 , 2025,45(2):153-164.
Gao Y M, Lin X F, Yang Y, et al. Identification and differential analysis of miRNAs associated with cell wall formation in *Phyllostachys edulis* under drought stress[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2025,45(2):153-164.

[9] Hackenberg M, Gustafson P, Langridge P, et al. Differential expression of microRNAs and other small RNAs in barley between water and drought conditions[J]. Plant Biotechnology Journal,2015,13:2-13.

[10] 刘晓佩 . 水稻 *OsMIR398* 功能分析 [D]. 成都 : 电子科技大学 , 2020:32-35.
Liu X P. Functional analysis of *OsMIR398*[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China,2020: 32-35.

[11] Kang T, Yu C Y, Liu Y, et al. Subtly manipulated expression of ZmmiR156 in tobacco improves drought and salt tolerance without changing the architecture of transgenic plants[J]. Frontiers in Plant Science,2020,10:1664.

[12] Chang X F, Chandra R, Berleth T, et al. Rapid, microscale, acetyl bromide-based method for high-throughput determination of lignin content in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56:6825-6834.

[13] 王亚琴 , 陈兴瑶 , 阳成伟 . 拟南芥多效性基因 *CPR5* 转化水稻中花 11 的研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版),2011,50(4):84-90.
Wang Y Q, Chen X Y, Yang C W. Transformation of pleiotropic gene *CPR5* from *Arabidopsis* into Zhonghua 11 (*Oryza sativa* L. subsp. *Japonica*)[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science Edition),2011,50(4):84-90.

[14] 郁慧 , 刘中亮 , 胡宏亮 , 等 . 干旱胁迫对 5 种植物叶绿体和线粒体超微结构的影响 [J]. 植物研究 ,2011,31(2):152-158.
Yu H, Liu Z L, Hu H L, et al. Effect of drought stress on the ultramicrostructures of chloroplasts and mitochondria of five plants[J]. Bulletin of Botanical Research,2011,31(2):152-158.

[15] Brodribb T J, Mcadam S A M. Abscisic acid mediates a divergence in the drought response of two conifers[J]. Plant Physiology,2013,162:1370-1377.

[16] Sunkar R, Li Y F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. Trends in Plant Science, 2012,17(4):196-203.

[17] 高帆 , 何中石 , 宋鞨 , 等 . 植物 miR398 家族的分子特征与进化分析 [J]. 中国农学通报 ,2020,36(11):33-42.
Gao F, He Z S, Song W, et al. miR398 family in plants: molecular characteristics and evolution analysis[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2020,36(11):33-42.

[18] Pashkovskii P P, Ryazanskii S S, Radyukina N L, et al. MIR398 and expression regulation of the cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase gene in *Thellungiella halophila* plants under stress conditions[J]. Russian Journal of Plant Physiology,2010, 57(5):707-714.

[19] Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, et al. MiRNA398b and miRNA398c are involved in the regulation of the SOD response in uranium-exposed *Arabidopsis thaliana* roots[J]. Environmental and Experimental Botany,2015,116:12-19.

[20] Li J, Song Q Q, Zuo Z F, et al. MicroRNA398: a master regulator of plant development and stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences,2022,23:10803.

[21] Fang L S, Wang Y M. MicroRNAs in woody plants[J]. Frontiers in Plant Science,2021,12:686831.

[22] Qiu P, Li J Y, Zhang L, et al. Polyethyleneimine-coated MXene quantum dots improve cotton tolerance to *Verticillium dahliae* by maintaining ROS homeostasis[J]. Nature Communications, 2023,14:7392.

[23] Yuan L Q, Dang J, Zhang J Y, et al. A glutathione S-transferase regulates lignin biosynthesis and enhances salt tolerance in tomato[J]. Plant Physiology,2024,196:2989-3006.

[24] 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.

[25] 尹伊咿 . 杨树 STTM-miR171c 的遗传转化及响应低氮胁迫的功能研究 [D]. 北京 : 北京林业大学 ,2022:11-13.
Yin Y Y. Genetic transformation of STTM-miR171c and its function in poplar response to low nitrogen stress[D]. Beijing: Beijing Forestry University,2022:11-13.

[26] 刘清 .MicroRNA408 通过影响木质素合成负向调节马铃薯的耐旱性 [D]. 兰州 : 甘肃农业大学 ,2025:54-59.
Liu Q. MicroRNA408 negatively regulates drought tolerance by controlling lignin synthesis in potato[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University,2025:54-59.

[27] 李莉梅 , 邹武 , 梁楚炎 , 等 . 一种可视化鉴定尾巨桉阳性转化子的基因编辑体系构建研究 [J]. 中南林业科技大学学报 , 2025,45(10):218-224.
Li L M, Zou W, Liang C Y, et al. Construction and transformation of CRISPR/Cas9 vector of *ALB3* gene in *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2025,45(10):218-224.

[28] 于晓倩 , 牛浩强 , 马茹暄 , 等 . 杨树抗炭疽病育种的 CRISPR/Cas9 技术应用研究 [J]. 树木医学 ,2025,2(2):61-68.
Yu X Q, Niu H Q, Ma R X, et al. Application of CRISPR/Cas9 technology in breeding anthracnose-resistant *Populus*[J]. Tree Health,2025,2(2):61-68.

[本文编校：张雨朦]