

具胁迫“记忆”特征的白木香离体根的 miRNA 分析

庄婷婷, 李佳欣, 詹若挺, 马新业*

广州中医药大学中药学院/岭南中药资源教育部重点实验室/国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东广州 510006

摘要: 本研究以白木香离体根为材料, 在经过连续三代盐胁迫处理后, 使用 EASYspin Plus 植物快速提取试剂盒提取样品的总 RNA, 利用 HiSeq 2500 高通量测序平台进行测序, 旨在探讨 miRNA 在白木香三代离体根盐胁迫中发挥的作用及可能参与调控的代谢途径, 为揭示白木香抵御盐胁迫机制的研究提供参考。取白木香三代盐胁迫的离体根为材料, 通过使用高通量测序平台及生物信息学技术, 获得第一代、第二代、第三代的 miRNA 表达谱, 筛选三代离体根中的差异 miRNA, 对差异 miRNA 进行靶基因预测, 之后进行靶基因分析, 从而获得可能参与白木香次生代谢产物及响应盐胁迫相关的 miRNA。结果显示: 第一代样品中共检测出 508 个已知 miRNA 和 764 个新预测 miRNA, 第二代样品中共检测出 444 个已知 miRNA 和 673 个新预测 miRNA, 第三代样品中共检测出 904 个已知 miRNA 和 1100 个新预测 miRNA。三代样品中共获得 59 个差异表达 miRNA 及 275 个靶基因, 上调的 miRNA 靶基因主要参与类黄酮生物合成、谷胱甘肽代谢等信号通路, 下调的 miRNA 靶基因则主要涉及苯丙烷类生物合成、植物激素信号传导、植物病原相互作用等信号通路。选取关键 miRNA 进行 NR 注释, 结果发现, miR8020-x 和 novel-m0628-5p 可能参与白木香离体根次生代谢产物合成; miR7494-y、miR477-y、miR5185-y、miR7757-y、miR408-z 和 novel-m0628-5p 可能响应白木香离体根盐胁迫。本研究利用高通量测序得到白木香离体根盐胁迫的 miRNA 表达谱, 并利用生物信息学分析得到可能参与白木香次生代谢产物及响应盐胁迫相关的 miRNA, 研究结果将有助于增强对白木香在盐胁迫条件下 miRNA 调控机制的认识, 并为白木香次生代谢产物合成提供新的途径。

关键词: 白木香; 胁迫记忆; miRNA; HiSeq 2500 高通量测序

中图分类号: S567.19

文献标志码: A

MiRNAs Analysis of *Aquilaria sinensis* Vitro Roots with Stress Memory Characteristic

ZHUANG Tingting, LI Jiaxin, ZHAN Ruoting, MA Xinye*

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine / Ministry of Education Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education / National Engineering Research Center for Proprietary Chinese Medicines R&D Laboratory of Southern Medicines, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract: The total RNA of *Aquilaria sinensis* vitro roots was extracted using the EASYspin Plus Plant Rapid Extraction Kit after three consecutive generations of salt stress treatment, and sequenced using the HiSeq 2500 high-throughput sequencing platform, aiming at exploring the roles of miRNAs in the three generations of *A. sinensis* vitro roots under salt stress and the metabolic pathways that may be involved in the regulation, and providing references to reveal the mechanisms of *A. sinensis*. The miRNA expression profiles of the first, second and third generations were obtained by using the high-throughput sequencing platform and bioinformatics technology, and the differential miRNAs in the three generations of vitro roots were screened, and the target genes of the differential miRNAs were predicted, and then

收稿日期 2024-11-26; 接受日期 2024-12-03

基金项目 广东省乡村振兴战略专项-农业科技发展及资源环境保护管理项目-广东省现代南药产业技术体系创新团队项目 (No. 2023KJ148)。

作者简介 庄婷婷 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 芳香药用植物资源学。*通信作者 (Corresponding author): 马新业 (MA Xinye), E-mail: usermxy@163.com。

the target gene analysis was performed to obtain the miRNAs that might be involved in the secondary metabolites of *A. sinensis* and those that were related to the response to salt stress. The results showed that 508 known miRNAs and 764 new predicted miRNAs were detected in the first-generation samples; 444 known miRNAs and 673 new predicted miRNAs were detected in the second-generation samples; 904 known miRNAs and 1100 new predicted miRNAs were detected in the third-generation samples. A total of 59 differentially expressed miRNAs and 275 target genes were obtained from the three samples. The up-regulated miRNA target genes were mainly involved in flavonoid biosynthesis and glutathione metabolism, while the down-regulated miRNA target genes were mainly involved in phenylpropanoid biosynthesis, Plant hormone signal transduction, plant-pathogen interactions and other signaling pathways. The key miRNAs were selected for NR annotation, and it was found that miR8020-x and novel-m0628-5p might be involved in the synthesis of secondary metabolites in *A. sinensis* vitro roots, and miR7494-y, miR477-y, miR5185-y, miR7757-y, miR408-z, and novel-m0628-5p might be responded to *A. sinensis* vitro roots salt stress. In this study, we used high-throughput sequencing to obtain miRNA expression profiles of *A. sinensis* vitro roots under salt stress, and bioinformatics analysis to obtain miRNAs that may be involved in secondary metabolites of *A. sinensis* and those related to the response to salt stress. The results of the present study will help to enhance the understanding of the miRNA regulatory mechanisms of *A. sinensis* under salt stress conditions and provide a new pathway for the synthesis of secondary metabolites of *A. sinensis*.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; stress memory; miRNAs; HiSeq 2500 high-throughput sequencing

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.005

盐胁迫作为一种严重影响植物生长发育的环境胁迫,可引发植物体内产生离子和渗透胁迫,进而影响植物体内次生代谢产物的积累或减少^[1-2]。多项研究表明,不同植物在应对盐胁迫时展现出独特的生理适应机制,如胡椒(*Piper Nigrum*)^[3]、连钱草(*Glechoma longituba*)^[4]和杠柳(*Periploca sepium* Bunge)^[5]在盐胁迫下某些次生代谢产物增加,而藏红花(*Crocus sativus*)^[6]和荆芥(*Schizonepeta tenuifolia*)^[7]中次生代谢产物则呈现出不同程度的减少。近年来的研究表明, MicroRNA (miRNA) 在植物盐胁迫响应中起着关键作用,并通过转录后调控靶基因表达影响植物耐盐性及次生代谢物合成^[8-9]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, MA 等^[10]发现 miR171 在盐胁迫下调控靶基因 *GRAS*, 通过改变植株根系 miRNA 的表达来提高植物的耐盐性。水稻(*Oryza sativa*)中,特定 miRNA (miR1841) 的过表达显著减轻了盐胁迫^[11]。这些研究成果为深入理解植物在盐胁迫下的分子调控机制奠定基础。

白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg]为瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属(*Aquilaria* L.)常绿乔木,其含树脂心材沉香,具有极高的药用价值,同时也是名贵香料,在医药、香料等行业有着广泛应用^[12]。然而,自然环境下,野生沉香属植物受损后通常需要数十年时间才能形成沉香木^[13],这极大地限制了沉香的供应,导致其市场需求与自然产出之间存在巨大差距。沉香木(结香)的

形成是树体在环境胁迫下逐渐积累次生代谢物的过程,因此,许多研究者致力于寻找有效的诱导方法来加速沉香的形成。盐胁迫作为一种化学诱导手段逐渐受到重视,因其能够诱导白木香愈伤组织产生 2-(2-苯乙基)色酮类化合物^[14],且白木香离体根在多代的盐胁迫下表现出“胁迫记忆”特征^[15],这表明着盐胁迫可能在白木香结香过程中扮演着重要角色。目前关于白木香中盐胁迫与 miRNA 的关系研究尚处于起步阶段。尤其是 miRNA 在盐胁迫下如何调控白木香次生代谢产物积累以促进结香的机制仍不清楚。鉴于此,本研究将对白木香三代离体根进行 Small RNA 测序,并结合生物信息学分析筛选出差异表达的 miRNA 及其靶基因。一方面,旨在揭示 miRNA 在白木香适应盐胁迫过程中的分子调控网络,为全面理解白木香抗逆机制提供关键依据;另一方面,通过分析次生代谢产物相关的 miRNA,探索其在促进白木香结香相关次生代谢过程中的潜在作用。尽管目前尚未有直接证据表明盐胁迫下白木香的结香时间、产量或质量会发生改变,但本研究有望为后续研究提供重要线索,从而为推动白木香抗逆性研究及促进沉香产业的可持续发展提供理论支撑和新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所采用的白木香种子来

源于广东省化州市维国沉香种植开发专业合作社, 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心的詹若挺教授通过参考《中国植物志》^[16]《中华人民共和国药典》^[17]鉴定其为白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg] 种子。

1.1.2 主要试剂 MS 培养基 (Murashige & Skoog Medium) 购自 Duchefa 公司; 蔗糖、琼脂购自 BioFroxx 公司; IBA (Indole-3-Butyric acid) 购自 Sigma 公司; NaCl 购自天津市大茂化学试剂厂; EASYspin Plus 植物快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 材料的获取 白木香的离体根获取过程涉及连续三代继代培养, 每次继代均分为 2 个阶段: 培养阶段和盐胁迫阶段。培养阶段: 首先通过无菌条件培育白木香组培苗, 筛选出长势良好的无菌苗根, 剪去根尖, 并剪成大约 2.0 cm 的根段。将根段置于含 1.0 mg/L IBA 的 1/2MS 液体培养基, 培养 7 d 后, 将根段转移至不含 IBA 的 1/2MS 培养基中, 继续培养 42 d (期间每 7 d 更换 1 次培养基), 从而获得初始的离体根材料。接下来, 进行第一次继代。盐胁迫阶段: 将离体根材料置于含 150 mmol/L NaCl 的 1/2MS 液体培养基中, 在 (25±1)℃ 的温度下, 以 110 r/min 的速度震荡培养 3 d, 之后从数瓶中取出离体根, 剪下侧根并将其标记为第一代 (G₁), 立即放入液氮速冻, 并储存在 -80℃ 的冰箱中。剩余的离体根则继续剪下侧根, 置于新的培养基中进行下一代的培养阶段, 即在不含 NaCl 的 1/2MS 中继续培养, 为后续盐胁迫做准备。同样的过程重复进行 2 次, 分别获得第二代 (G₂) 和第三代 (G₃) 的盐胁迫侧根材料。每次继代都遵循先培养后胁迫模式, 确保每代侧根都经历相同的处理流程。最后, 将 G₁、G₂、G₃ 用于 Small RNA 测序。

1.2.2 Small RNA 文库构建与 HiSeq2500 测序 采用 EASYspin Plus 植物快速提取试剂盒提取经过胁迫处理的白木香离体根样品的总 RNA。随后, 将提取的高质量 RNA 样本送至广州基迪奥生物科技有限公司, 构建文库。文库构建完成后, 采用 Illumina HiSeq 2500 测序平台进行测序。

1.2.3 基因表达量分析 对测序得到的 raw data 文件进行数据过滤, 剔除低质量的 reads、不带有 3'接头的 reads 及含有 5'接头的 reads, 最后得到 Small RNA 的 tag 序列。接着, 利用 GenBank 和

Rfam (11.0) 数据库来对这些 tag 序列进行注释, 尽可能地识别并剔除样本中可能存在的 rRNA, scRNA、snoRNA、snRNA 和 tRNA。将最终得到的 tag 序列同 miRBase 中已知的植物或动物 miRNA 进行比对, 鉴定到的 miRNA 即为已知 miRNA。去除鉴定为已知的 miRNA, 挑选出能够比对上基因组的 tag, 使用软件 MIREAP v0.2 预测 miRNA 特殊的二级结构, 找出可能存在的新的 miRNA。对各个样品鉴定的 miRNA 进行汇总, 并依据 TPM (tags per million) 公式计算每个 miRNA 的表达量, $TPM = T \times 10^6 / N$ [T 表示 miRNA 的 tags, N 表示总 miRNA 的 tags (已存在+已存在编辑+已知+新预测 miRNA counts 数之和)]。通过这一过程, 获得所有样品的全部 miRNA 的表达谱。

1.2.4 miRNA 的靶基因预测及靶基因富集分析 使用 patmatch v1.2 软件对样本中的 miRNA 和靶基因进行互补配对分析, 并设定严格的筛选标准预测最终结果。筛选标准包括: 整个互补关系中最多允许 4 个错配 (其中 G-U 配对视为 0.5 个错配), 且不允许连续错配; miRNA 的 5'端第 2~12 位及 miRNA 与靶基因的第 10~11 位必须完全匹配, 不允许错配; miRNA 与靶基因的 5'端 1~12 位置内, 最多允许 2.5 个错配; 同时, miRNA 与靶基因的最小自由能 (MFE) 需达到或超过完美匹配时 MFE 的 60%。完成预测后, 将所得的靶基因与 GO、KEGG 数据库进行比对, 以进行功能上的注释及分类处理, 从而获取有关这些靶基因的详细注释信息。

2 结果与分析

2.1 所有样本中 miRNA 图谱概述

高通量测序结果显示, 白木香离体根盐胁迫样品 (G₁-1、G₁-2、G₁-3、G₂-1、G₂-2、G₂-3、G₃-1、G₃-2 和 G₃-3) miRNA 文库中, 所有样品的 clean tags 均大于 85% (表 1), 表明所得 miRNA 数据可靠, 可用于后续分析。miRNA 测序得到的 tag 序列长度主要分布在 21 nt 和 24 nt (图 1), 与植物中 miRNA 的分布相符合。基于 miRBase 和参考基因组对 miRNA 进行鉴定, 在白木香样品 G₁-1、G₁-2、G₁-3、G₂-1、G₂-2、G₂-3、G₃-1、G₃-2、G₃-3 中分别发现了 282、119、107、94、230、120、365、278、261 个已知 miRNA, 421、149、194、106、424、143、435、284、381 个新 miRNA,

表 1 样品数据过滤数据统计
Tab. 1 Sample data filtering statistics

编号 No.	高质量序列(占比) High_quality (ratio/%)	无 3'端接头的序列(占比) 3' adapter_null (ratio/%)	含 5'端接头的序列 5'(占比) adapter_contaminants (ratio/%)	小于 18 bp 的序列(占比) Smaller_than_18nt (ratio/%)	纯净序列(占比) Clean_tags (ratio/%)
G ₁ -1	13 656 935(98.6)	38 554(0.3)	16 429(0.1)	685 384(5.0)	12 828 377(93.9)
G ₁ -2	13 521 873(98.7)	30 420(0.2)	33 828(0.3)	1 258 681(9.3)	11 760 730(87.0)
G ₁ -3	14 737 562(98.8)	27 486(0.2)	41 657(0.3)	955 116(6.5)	13 336 291(90.5)
G ₂ -1	10 209 976(99.2)	4 438(0.4)	22 864(0.2)	398 519(4.0)	9 512 104(93.2)
G ₂ -2	13 304 295(98.6)	15 190(0.1)	17 331(0.1)	734 884(5.5)	12 472 052(94.0)
G ₂ -3	11 186 638(99.4)	27 872(0.2)	95 341(0.9)	1 267 715(11.3)	9 548 798(85.4)
G ₃ -1	15 764 705(98.7)	24 510(0.2)	24 522(0.2)	1 419 687(9.0)	14 217 036(90.2)
G ₃ -2	15 340 433(98.7)	23 005(0.2)	38 022(0.2)	1 829 675(11.9)	13 346 541(87.0)
G ₃ -3	11 642 970(99.3)	15 248(0.1)	28 321(0.2)	1 043 192(9.0)	10 499 617(90.2)

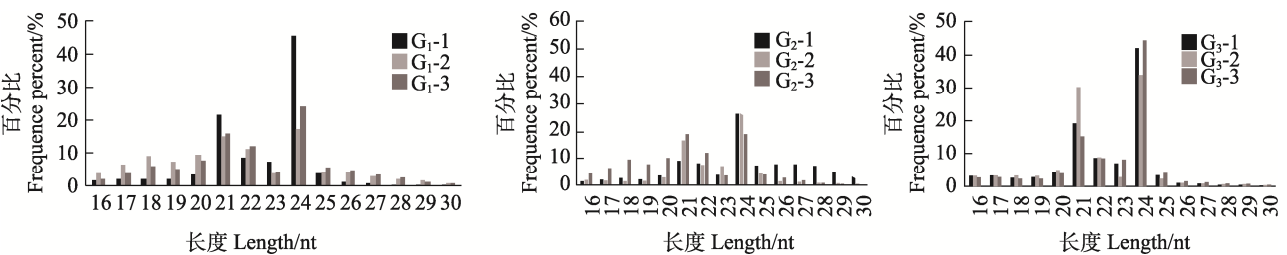


图 1 白木香离体根盐胁迫下 miRNA 长度分布
Fig. 1 Distribution of miRNA lengths under salt stress in *A. sinensis* vitro roots

共鉴定出 1476 个 miRNA (图 2)。G₃ 代样品中已知 miRNA 和新 miRNA 的数量明显多于 G₁ 和 G₂ 代, 表明随着盐胁迫代数的增加, 白木香离体根的 miRNA 表达调控更加复杂, 可能涉及更多的基因表达调控过程。

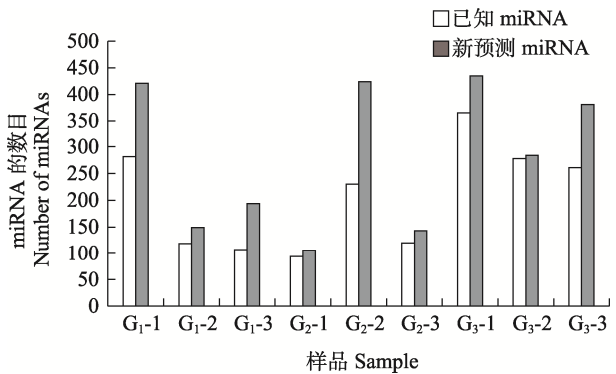


图 2 离体根盐胁迫处理下鉴定的已知 miRNA 和新预测 miRNA
Fig. 2 Known miRNAs and new predicted miRNAs identified under salt stress treatment in vitro roots

2.2 盐胁迫下 miRNA 的表达量分析

所有样品中共鉴定出 1476 个 miRNA, 包括 794 个已知 miRNA 和 682 个新预测 miRNA。在

已知 miRNA 中, miR166-y 的表达量最高, 在 G₃ 样本中其表达量达到 6 264 167.887, 其次是 miR396-x 和 miR156-x; 在新预测 miRNA 中, novel-m0109-3p 的表达量最高, 在 G₃ 样本中其表达量为 30 391.845, 其次是 novel-m0497-3p 和 novel-m0108-3p (表 2)。进一步分析 3 个样品中 miRNA 的差异表达, 发现 miR166-y、miR396-x 和 novel-m0109-3p 在 G₃ 中的表达占优势, novel-m0224-3p 和 novel-m0213-5p 在 G₂ 中的表达量较高, novel-m0497-3p 在 G₁ 中表达量较高。

2.3 盐胁迫下 miRNA 差异表达分析

使用 edgeR 软件(默认参数)对 miRNA 进行差异分析(图 3A)。差异 miRNA 是以表达量变化 2 倍以上, 并且 *P* 值小于 0.05 作为筛选标准。在鉴定出的 1465 个 miRNA 中有 59 个 miRNA 差异表达(21 个上调, 38 个下调)。在 G₁ vs G₂ 检测出 3 个差异表达 miRNA(1 个上调和 2 个下调); 在 G₁ vs G₃ 中检测出 26 个差异表达 miRNA(7 个上调和 19 个下调); 在 G₂ vs G₃ 中检测出 30 个差异表达 miRNA(13 个上调和 17 个下调)。为了更清晰地揭示 3 组中差异基因的表达趋势, 筛选并整理每组中排名前 10 的上调/下调 miRNA

表 2 样品表达量前 10 的已知 miRNA 和新预测 miRNA 统计
Tab. 2 Statistics of the top 10 known miRNAs and new predicted miRNAs expressed in samples

miRNA	长度 Length/nt	序列 Sequence	G ₁	G ₂	G ₃
miR166-y	21	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	2 316 253.769	3 947 914.119	6 264 167.887
miR396-x	21	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	675 094.116	1 217 643.213	1 892 737.329
miR156-x	21	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	283 127.753	522 513.619	805 641.373
miR157-x	21	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	228 373.079	417 354.525	645 727.604
miR398-x	21	GGAGCGACCTGAGATCACATG	123 522.997	242 633.392	366 156.389
miR408-x	21	CAGGGAAGAGACAGAGCATGG	98 874.286	177 519.784	276 394.070
miR159-y	21	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	84 214.939	143 643.680	227 858.619
miR7122-x	22	TTAGACAGAGAAATCACGGTGG	80 259.852	138 766.818	219 026.669
miR162-y	21	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	64 593.526	112 598.561	177 192.087
miR156-y	21	GCTCACTCTCTATCTGTCACC	38 787.990	73 348.811	112 136.801
novel-m0109-3p	21	ACCGTGTTCCTCTGTTTCGAAC	12 675.659	8037.969	30 391.845
novel-m0497-3p	21	CATGTGCCCCCTCTTCCCCATC	11 044.516	9688.187	344.175
novel-m0108-3p	20	CCACCGTGTTCCTCTGTCTA	6893.590	4270.412	8597.977
novel-m0109-5p	22	TCGAACAGAGAAATCACGGTTG	5102.004	6405.531	7949.745
novel-m0224-3p	22	TTGTCCTTGCGCATGGTTCCTC	3186.141	3446.286	1934.236
novel-m0105-3p	22	TCGAAGGGGATGGGAGGGATGG	2156.164	1989.688	383.329
novel-m0106-3p	22	TCGAAGGGGATGGGAGGGATGG	2156.164	1989.688	383.329
novel-m0611-5p	21	GGAATGTTGTCTGTTTCGATG	1573.424	1526.025	3309.866
novel-m0213-5p	21	TCCCTCCATCGTACCAGCTTT	886.198	1156.272	457.478
novel-m0317-5p	21	AGATATTGGCGTGCCTCAATC	817.402	848.404	1045.881

(表 3)。在 G₁ vs G₃ 中, novel-m0141-5p 和 novel-m0098-3p 是显著上调的差异 miRNA, 而 novel-m0561-3p 和 miR7757-y 则显著下调; G₂ vs G₃ 中, novel-m0098-3p 和 miR7494-y 呈显著性上调, 而 novel-m0628-5p 和 miR5185-y 则显著下调。结合韦恩图分析(图 3B), 得出 G₁ vs G₂ 和 G₁ vs G₃ 两组间共有 1 个差异 miRNA, G₁ vs G₂ 和 G₂ vs G₃ 两组间共有 1 个差异 miRNA, G₁ vs G₃ 和 G₂ vs G₃ 两组间共有 10 个差异 miRNA。在 G₁ vs G₂、G₁ vs G₃ 和 G₂ vs G₃ 三组中分别有 1、15、19 个差异 miRNA 特异性表达。3 个比较组中没有共同的差异表达 miRNA。

2.4 差异靶基因 GO 功能注释

为了筛选出白木香三代离体根中与盐胁迫应答及次生代谢物产生相关的 miRNA, 使用 PatMatch 软件对白木香一代、二代和三代盐胁迫下离体根的全部 miRNA 基因进行预测, 共得到靶基因 13 617 个, 靶基因位点 23 504 个。其中, 已知 miRNA 预测到的靶基因有 13 276 个, 靶基因位点 22 285 个; 而预测到的新 miRNA 靶基因有 935 个, 靶基因位点 1 219 个。差异表达 miRNA 通过改变其靶基因的表达模式参与植物胁迫应答^[18]。因此, 对筛选得到的 275 个差异 miRNA 靶基因进行 GO 功能注释, 其按照生物学过程、分

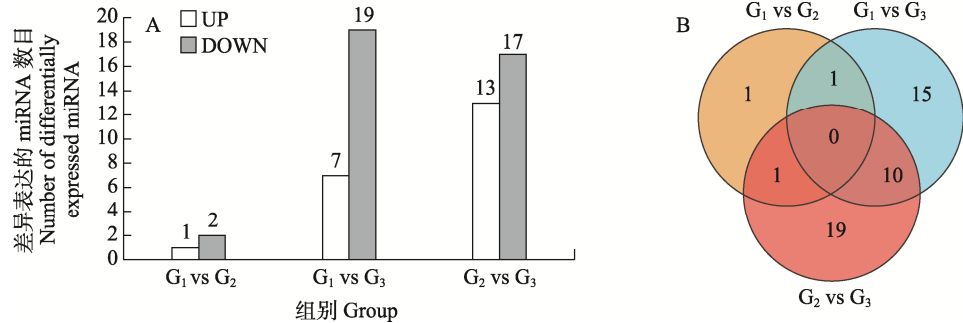


图 3 盐胁迫下白木香三代离体根差异表达 miRNA 分析

Fig. 3 Differentially expression analysis of miRNAs in three generations of *A. sinensis* vitro roots under salt stress

表 3 各组间差异表达量前 10 的 miRNA
Tab. 3 Top 10 up-regulated, down-regulated miRNAs with differential expression between groups

组 Group	上调 miRNA Up-regulated miRNA	差异倍数 Fold change	P 值 P value	下调 miRNA Down-regulated miRNA	差异倍数 Fold change	P 值 P value
G ₁ vs G ₂	novel-m0001-5p	11.397 767	0.044 648	novel-m0244-5p	-11.800 946	0.037 762
				novel-m0271-3p	-11.621 815	0.039 966
G ₁ vs G ₃	novel-m0141-5p	10.711 567	0.005 860	novel-m0561-3p	-11.631 160	0.006 446
	novel-m0098-3p	10.434 395	0.004 184	novel-m0271-3p	-11.621 815	0.011 475
	novel-m0226-3p	9.779 479	0.037 407	novel-m0161-3p	-10.997 967	0.022 497
	novel-m0065-3p	7.466 889	0.001 222	novel-m0620-3p	-10.867 173	0.033 285
	novel-m0308-3p	3.919 291	0.046 455	novel-m0363-5p	-10.806 778	0.028 692
	novel-m0308-5p	3.436 403	0.047 956	novel-m0593-3p	-10.570 279	0.018 212
	miR390-y	3.360 268	0.040 017	miR7757-y	-10.419 788	0.041 477
				novel-m0396-5p	-7.516 096	0.002 802
				novel-m0591-5p	-6.616 241	0.002 381
				novel-m0256-5p	-6.374 034	0.003 907
G ₂ vs G ₃	novel-m0098-3p	10.434 395	0.000 858	novel-m0628-5p	-11.209 329	0.012 424
	novel-m0015-3p	9.222 352	0.026 771	novel-m0099-5p	-11.113 369	0.037 838
	novel-m0441-3p	9.079 351	0.043 641	novel-m0561-3p	-10.916 666	0.018 517
	miR7494-y	9.075 871	0.039 750	novel-m0533-3p	-10.238 285	0.044 501
	novel-m0320-3p	5.261 913	0.033 898	novel-m0336-3p	-10.085 393	0.046 369
	novel-m0321-3p	5.261 913	0.033 822	novel-m0396-5p	-6.720 578	0.004 122
	novel-m0238-5p	4.956 819	0.006 719	novel-m0001-5p	-6.532 673	0.008 632
	novel-m0065-3p	4.696 587	0.006 680	novel-m0591-5p	-6.268 276	0.000 886
	novel-m0652-5p	4.402 037	0.032 568	miR5185-y	-6.216 985	0.045 925
	novel-m0464-3p	4.098 503	0.043 383	novel-m0256-5p	-5.654 693	0.002 052

子功能和细胞组分分为 3 类（图 4），其中生物学过程涉及的 GO 条目最多，有 19 个；分子功能和细胞组分涉及的条目分别为 8 个和 9 个。在生物学过程中主要富集在细胞过程（cellular process）、代谢过程（metabolic process）和单一有机体过程（single organism process），相关的靶基因数目分别为 91、88 和 64；在分子功能方面主要富集在催化活性（catalytic activity）和结合（binding），相关的靶基因数目分别为 81 和 56；在细胞组成部分主要富集在细胞部分（cell part）、细胞（cell）和细胞器（organelle），相关的靶基因数目分别为 44、44 和 40。

2.5 差异靶基因 KEGG 富集分析

为了进一步了解差异靶基因的生物学功能，本研究对各组间差异表达的 miRNA 的靶基因进行富集分析（图 5）。结果表明，显著富集的通路有 40 条，涉及 57 条差异表达的 miRNA 靶基因。其中，涉及代谢通路、植物次生代谢和植物激素信号传导途径的靶基因较多，分别是 16、11

和 5 个。将参与关键代谢途径中富集的靶基因与对应的 miRNA 进行联合分析及 NR 注释（表 4），发现富集到的代谢通路共涉及了 6 个下调和 4 个上调的差异 miRNA。其中下调的 miRNA 包括 miR477-y、miR5185-y、novel-m0161-3p、novel-m0628-5p、miR408-z 和 miR7757-y，而上调的 miRNA 包括 miR7494-y、novel-m0098-3p、novel-m0320-3p 和 miR8020-x。这些 miRNA 在特定的比较组中具有特异性表达：miR477-y、miR408-z、miR7757-y、novel-m0161-3p 在 G₁ vs G₃ 中特异性表达，而 miR5185-y、miR7494-y、novel-m0628-5p、novel-m0320-3p 和 miR8020-x 则在 G₂ vs G₃ 中特异性表达。进一步分析发现，下调的 miRNA 靶基因主要涉及糖酵解/糖异生成、苯丙烷类生物合成、植物激素信号传导、植物病原相互作用等信号通路。而上调的 miRNA 靶基因则主要参与类黄酮生物合成、谷胱甘肽代谢等信号通路。

NR 注释结果显示，miR8020-x 的靶基因与查尔酮黄酮异构酶有关；miR7494-y 的 2 个靶基因

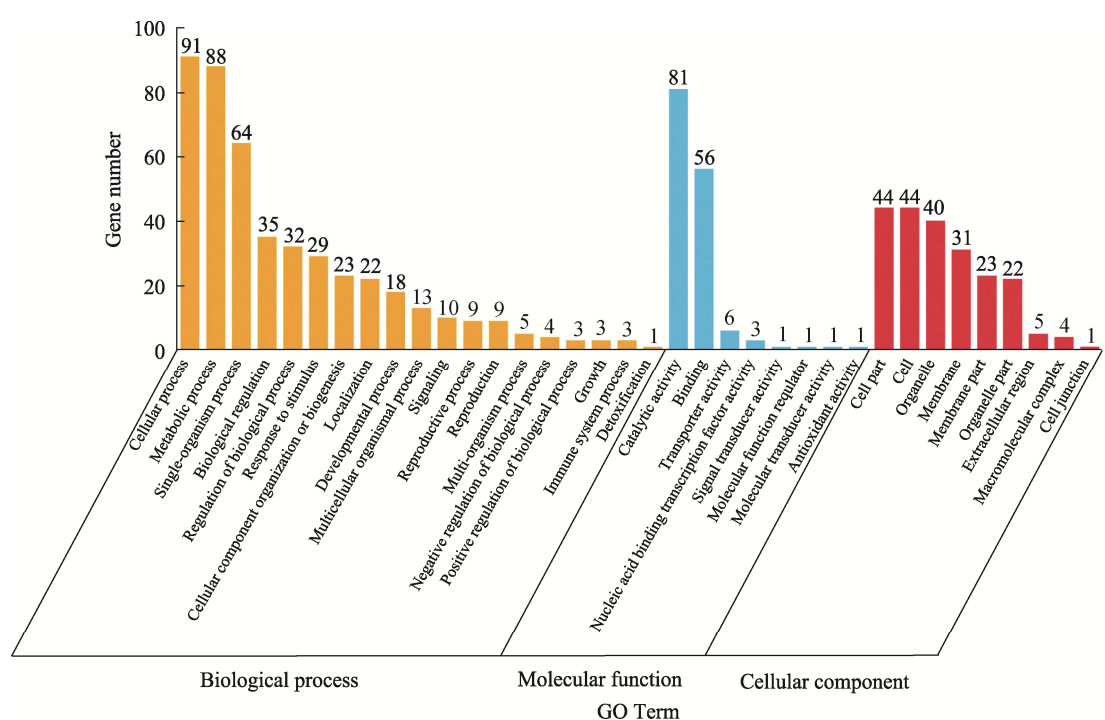


图 4 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能注释

Fig. 4 GO functional annotation of differentially expressed miRNA target genes

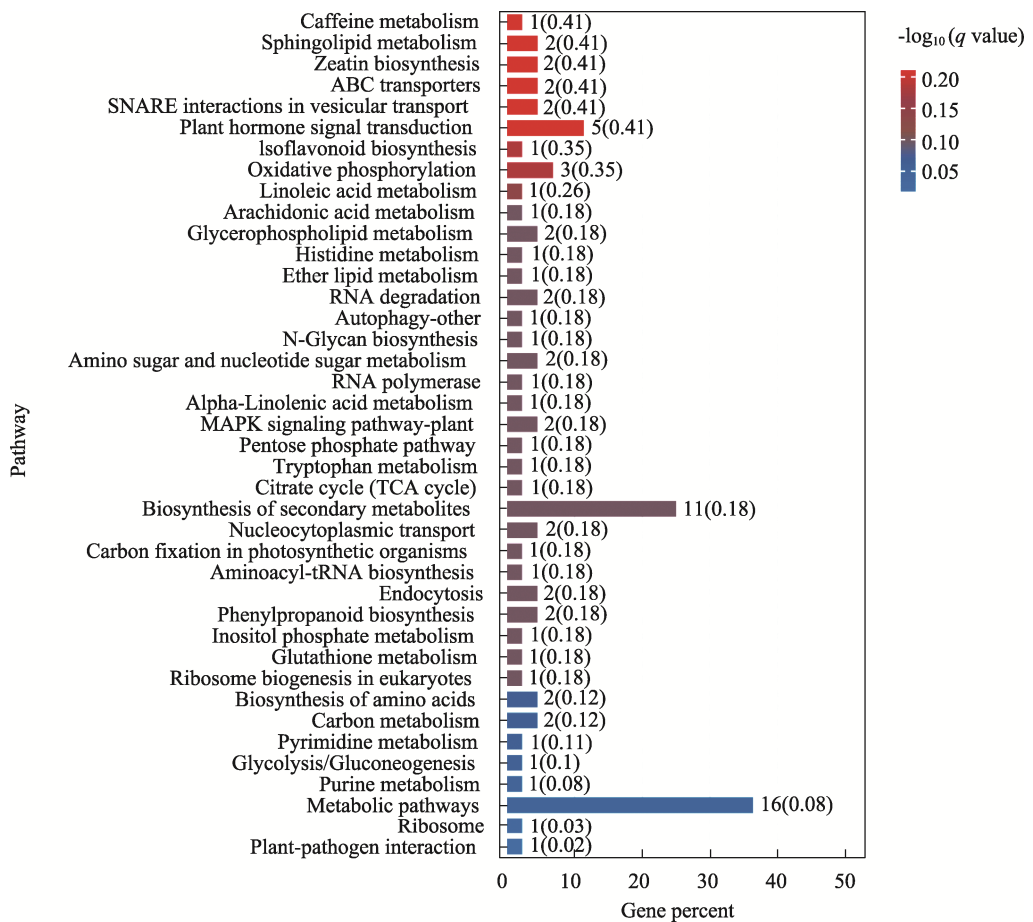


图 5 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes

表 4 差异 miRNA 靶基因关键通路和 NR 注释
Tab. 4 Differential miRNA key pathways and NR annotation

序号 No.	通路编号 ID	通路名称 Pathway name	靶基因 Target genes	miRNA	NR 注释 NR note
1	ko00010	糖酵解/糖异生成 Glycolysis / Gluconeogenesis	evm.model.Scaffold 1.84	novel-m0628-5p	醛糖-1-/葡萄糖-6-磷酸 1-酰亚胺酶[黄麻] Aldose 1-/Glucose-6-phosphate 1-epimerase [<i>Corchorus capsularis</i>]
2	ko01100	代谢途径 Metabolic pathways	evm.model.Scaffold 446.31	miR8020-x	查尔酮黄酮异构酶 [桃] chalcone flavonone isomerase [<i>Prunus persica</i>]
			evm.model.Scaffold 139.25	novel-m0628-5p	预测：线粒体含 CBS 结构域的蛋白 CBSX3 [柑橘] PREDICTED: CBS domain-containing protein CBSX3, mitochondrial [<i>Citrus sinensis</i>]
3	ko00943	类黄酮生物合成 flavonoid biosynthesis	evm.model.Scaffold 446.31	miR8020-x	查尔酮黄酮异构酶 [桃] chalcone flavonone isomerase [<i>Prunus persica</i>]
4	ko00940	苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	evm.model.Scaffold 167.8	miR5185-y	预测：过氧化物酶 44 [梅] PREDICTED: peroxidase 44 [<i>Prunus mume</i>]
5	ko00480	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	evm.model.Scaffold 195.28	miR7494-y	预测：可能的谷胱甘肽过氧化物酶 2 [可可豆] PREDICTED: probable glutathione peroxidase 2 [<i>Theobroma cacao</i>]
6	ko03018	RNA 降解 RNA degradation	evm.model.Scaffold 216.1	novel-m0098-3p	RNA 螺旋酶，ATP 依赖性，SK12/DOB1 蛋白 同工酶 4 [可可豆] RNA helicase, ATP-dependent, SK12/DOB1 protein isoform 4 [<i>Theobroma cacao</i>]
			evm.model.Scaffold 26.304	novel-m0161-3p	预测：可能的 CCR4 相关因子 1 同源物 11[胡杨] PREDICTED: probable CCR4-associated factor 1 homolog 11 [<i>Populus euphratica</i>]
7	ko04075	植物激素信号传导 Plant hormone signal transduction	evm.model.Scaffold 1.585	miR7494-y	富亮氨酸受体样蛋白激酶家族蛋白 [可可豆] Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein [<i>Theobroma cacao</i>]
			evm.model.Scaffold 24.124	miR7757-y	生长因子 B3 家族蛋白/辅助因子 AUX/IAA 相 关同工酶 1 [可可豆] ranscriptional factor B3 family protein / auxin- responsive factor AUX/IAA-related isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]
			evm.model.Scaffold 403.11	miR408-z	预测：类生长素反应蛋白 IAA6 [陆地棉] PREDICTED: auxin-responsive protein IAA6-like [<i>Gossypium hirsutum</i>]
			evm.model.Scaffold 140.3	miR5185-y	含 F-box/WD 重复蛋白 pof10 [豆属] F-box/WD repeat-containing protein pof10 [<i>Glycine soja</i>]
8	ko04016	MAPK 信号通路-植物 MAPK signaling pathway-plant	evm.model.Scaffold 43.133	novel-m0628-5p	预测：有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 2 同工酶 X1 [柑橘属植物] PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase 2 isoform X1 [<i>Citrus sinensis</i>]
9	ko04144	内吞作用 Endocytosis	evm.model.Scaffold 3.680	novel-m0320-3p	SEC7 样蛋白[黄麻] SEC7-like protein [<i>Corchorus capsularis</i>]
10	ko04626	植物-病原体相互作用 Plant-pathogen interaction	evm.model.Scaffold 8.140	miR477-y	预测：lysM 结构域受体样激酶 3[可可豆] PREDICTED: lysM domain receptor-like kinase 3 [<i>Theobroma cacao</i>]

分别可能与谷胱甘肽过氧化物酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶有关；miR5185-y 的靶基因与含 F-box/WD 重复蛋白相关；miR477-y 的靶基因与 lysM 结构域受体样激酶 3 相关；miR7757-y 的靶

基因与生长因子 B3 家族蛋白/辅助因子 AUX/IAA 相关同工酶 1 相关；miR408-z 与类生长素反应蛋白 IAA6 相关；novel-m0628-5p 与有丝分裂原活化蛋白激酶 2 同工酶 X1 有关。

3 讨论

3.1 可能参与白木香离体根次生代谢产物有关的 miRNA

结合 GO 功能注释、KEGG 富集分析及差异 miRNA 的 NR 注释,发现靶基因主要在细胞过程、代谢过程和催化活化等功能和植物激素信号传导代谢途径富集。部分 miRNA 靶基因可能与白木香次生代谢产物有关,而另一些 miRNA 靶基因则可能与白木香离体根响应盐胁迫相关。在三代盐胁迫处理的离体根中共获得 59 个差异 miRNA,其中,在 G_1 vs G_2 、 G_1 vs G_3 、 G_2 vs G_3 三个比较组中分别有 1、7、13 个上调的差异 miRNA,有 2、19、17 个下调的差异 miRNA。上调差异 miRNA 随着胁迫代数的增加逐渐增加,在 G_1 vs G_3 和 G_2 vs G_3 两个比较组过渡中下调差异 miRNA 反而减少了,这暗示了白木香在连续多代盐胁迫下,其基因表达调控发生了复杂的变化。

查尔酮异构酶基因 (*CHI*) 的表达可以促进植物体内黄酮类次生代谢物的合成^[19]。本研究 miR8020-x 预测的靶基因 *evm.model.Scaffold446.31* 与查尔酮异构酶相关。因此,推测 miR8020-x 可能通过影响靶基因表达水平来调节次生代谢途径中查尔酮异构酶的活性,从而影响类黄酮次生代谢物的合成,但这还需要进一步的实验验证。此外,差异基因 *novel-m0628-5p* 的靶基因 *evm.model.Scaffold139.25* 和 *evm.model.Scaffold43.133* 分别与 *CBSX3* 和有丝分裂原活化蛋白激酶 (*MAPK*) 相关,而 *CBSXs* 参与拟南芥的组织发育和胁迫响应过程^[20], *MAPKK* 可能参与沉香中 2-苯乙基色酮的生物合成^[21]。因此,本研究推测差异基因 *novel-m0628-5p* 不仅响应白木香离体根盐胁迫,还可能参与白木香中 2-(2-苯乙基)色酮类物质的合成。

3.2 可能参与白木香离体根抵御盐胁迫有关的 miRNA

在盐胁迫环境下,胡杨 (*Populus euphratica*) 能够上调谷胱甘肽过氧化物酶的表达,维持总体抗氧化活性^[22]。本研究发现,特定 miRNA 如 miR7494-y 的靶基因 *evm.model.Scaffold195.28* 与谷胱甘肽过氧化物酶 2 相关,并参与过氧化物酶活性 (GO:0004601)、毒素代谢过程 (GO:0009404)、激素介导的信号通路 (GO:0009755) 等过程;其靶基因 *evm.model.scaffold7.53* 调节丝氨酸/苏氨

酸蛋白激酶活性,参与植物信号传导通路。因此,推测 miR7494-y 通过调控靶基因 *evm.model.Scaffold195.28* 和靶基因 *evm.model.scaffold7.53* 的表达,增强白木香离体根在盐胁迫下的抗氧化能力和信号传导,从而提高其耐盐性。本研究中,差异 miR5185-y 预测的靶基因 *evm.model.Scaffold140.3* 与 F-box 相关,而 F-box 蛋白家族成员也广泛参与植物逆境响应^[23]。因此,本研究推测 miR5185-y 参与离体根响应盐胁迫。

miR477 在茶树 (*Camellia sinensis*) 中对逆境 (如干旱、盐等) 的响应起着重要的调控作用^[24]。miR7757 参与小麦 (*Triticum aestivum*) 种子萌发过程^[25]。在拟南芥中的研究表明,miR408 的过表达能增强其对盐度、寒冷及氧化应激耐受,但提高了对干旱和渗透胁迫敏感性^[26]。在本研究中,miR477-y、miR7757-y 和 miR408-z 呈现出差异表达,说明这些 miRNA 可能与白木香响应盐胁迫有着重要的相关作用。已知 *LysM* 类受体激酶在植物抗逆及防御机制中起关键作用,并且,在战明慧^[27]的研究中,发现苹果 (*Malus pumila*) 中的 *LysM* 类受体激酶 *MdLYK15* 负调控苹果对腐皮镰孢菌的抗性。而本研究发现,miR477-y 的靶基因 *evm.model.Scaffold8.140* 与含有 *lysM* 结构域的受体样激酶相关,该基因参与植物病原体相互作用,并可能通过调控离体根来增强对盐胁迫的抵御能力。此外,*CBSXs* 蛋白和 *AUX/IAA* 蛋白等也被证实参与植物的胁迫响应过程^[20, 28]。本研究发现,差异表达基因 miR7757-y 的靶基因 *evm.model.Scaffold24.124* 调控植物激素信号传导中的 *AUX/IAA* 蛋白,而 miR408-z 的靶基因 *evm.model.Scaffold403.11* 则调控生长素反应蛋白 *IAA6*,这些调控作用共同影响了白木香离体根的生长和对盐胁迫的适应能力。综上所述,本研究推测 miR8020-x 和 *novel-m0628-5p* 可能参与白木香离体根次生代谢产物的合成,而 miR7494-y、miR477-y、miR5185-y、miR7757-y、miR408-z 和 *novel-m0628-5p* 则可能参与白木香离体根对盐胁迫的响应。然而,本研究尚未对这些 miRNA 进行功能验证及开展深入的作用机制研究。特别是在分析过程中,尚未获得直接证据来证实分析中的差异 miRNA 与“记忆”相关。因此,后续将聚焦于对这些差异 miRNA 的功能验证,旨在明确它们在盐胁迫过程中的具体作用机制,并进一步探索它们与胁迫“记忆”特征之间的潜在联系。

参考文献

- [1] ZHAO S S, ZHANG Q K, LIU M Y, ZHOU H P, MA C L, WANG P P. Regulation of plant responses to salt stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4609.
- [2] MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 444(2): 139-58.
- [3] NAVARRO J M, FLORES P, GARRIDO C, MARTINEZ V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity[J]. Food Chemistry, 2006, 96: 66-73.
- [4] 宋方帅. 盐胁迫对连钱草药效成分累积影响的研究[D]. 恩施: 湖北民族大学, 2020.
- SONG F S. Effects of salt stress on the accumulation of medicinal ingredients of *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.[D]. Enshi: Hubei Minzu University, 2020. (in Chinese)
- [5] 韩翠婷, 李先宽, 王广莘, 马琳, 张坚. 盐胁迫对杠柳幼苗生长及次生代谢产物积累的影响[J]. 西北植物学报, 2024, 44(2): 280-287.
- HAN C T, LI X K, WANG G P, MA L, ZHANG J. Growth and accumulation of the secondary metabolites in *Periploca sepium* Bunge seedlings under salt stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(2): 280-287. (in Chinese)
- [6] MOSLEMI F S, VAZIRI A, SHARIFI G, GHARECHAH J. The effect of salt stress on the production of apocarotenoids and the expression of genes related to their biosynthesis in saffron[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(2): 1707-1715.
- [7] 周莹. 盐胁迫对荆芥生长生理及次生代谢的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- ZHOU Y. Effects of salt stress on the growth, physiology and secondary metabolism of *Schizonepeta tenuifolia* Briq.[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [8] MORO B, CHOROSTECKI U, ARIKIT S, SUAREZ I P, HÖBARTNER C, RASIA R M, MEYERS B C, PALATNIK J F. Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(20): 10709-10723.
- [9] 杨航, 李航, 高崎. MicroRNA 调控药用植物帖类生物合成研究进展[J]. 中国现代中药, 2023, 25(2): 403-412.
- YANG H, LI H, GAO Q. Biosynthesis and regulation of terpene metabolites in medicinal plants by MicroRNA[J]. Modern Chinese Medicine, 2023, 25(2): 403-412. (in Chinese)
- [10] MA H S, LIANG D, SHUAI P, XIA X L, YIN W L. The salt-and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 4011-4019.
- [11] AI B, CHEN Y, ZHAO M, DING G, XIE J, ZHANG F. Overexpression of miR1861h increases tolerance to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2021, 68: 87-92
- [12] 戴好富, 梅文莉. 沉香实用栽培和人工结香技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- DAI H F, MEI W L. Technology of agarwood trees cultivation and agarwood artificial formation[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015. (in Chinese)
- [13] SHIVANAND P, ARBIE N F, KRISHNAMOORTHYS, AHMAD N. Agatwood-the fragrant molecules of a wounded tree[J]. Molecules, 2022, 27(11): 3386.
- [14] WANG X, GAO B, LIU X, DONG X, ZHANG Z, FAN H, ZHANG L, WANG J, SHI S, TU P. Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylethyl) chromones and regulates novel classes of responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* calli[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 119.
- [15] 李文月. 白木香连续三代离体根盐胁迫处理及转录组初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- LI W Y. The study of NaCl stress treatment and transcriptome in three consecutive generations of *Aquilaria sinensis* vitro roots[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018. (in Chinese)
- [16] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志: 第51卷[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- Chinese Flora Committee, Chinese Academy of Sciences. Flora of China: volume 51[M]. Beijing: Sciences Press, 1995. (in Chinese)
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版): 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 130.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015): volume I[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 130. (in Chinese)
- [18] 陈晓婷, 刘军, 孙翠霞, 林桂芳. 草酸胁迫下拟南芥三个差异表达 microRNA 的分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(4): 432-439.
- CHEN X T, LIU J, SUN C X, LIN G F. Three differentially expressed MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana* under the stress of oxalic acid[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(4): 432-439. (in Chinese)
- [19] 周明, 沈勇根, 朱丽琴, 艾啸威, 曾璟, 杨洪烨. 植物黄酮化合物生物合成、积累及调控的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(18): 216-221.
- ZHOU M, SHEN Y G, ZHU L Q, AI X W, ZHEN J, YANG

- H Y. Research progress on biosynthesis, accumulation and regulation of flavonoids in plants[J]. Food Research and Development, 2016, 37(18): 216-221. (in Chinese)
- [20] OK S H, YOO K S, SHIN J S. CBSXs are sensor relay proteins sensing adenosine-containing ligands in *Arabidopsis*[J]. Plant Signaling Behavior, 2012, 7(6): 664-667.
- [21] 董先娟. H₂O₂、MAPKs 蛋白激酶对白木香愈伤中 2-苯乙基色酮合成的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- DONG X J. Effects of H₂O₂ and MAPKs protein kinase on the content of 2-(2-phenylethyl) chromones in the healing wounds of *Aquilaria sinensis*[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018. (in Chinese)
- [22] 王菲菲, 丁明全, 邓澍荣, 王美娟, 孙健, 候佩臣, 马旭君, 张玉红, 赵楠, 沈昕, 陈少良. 胡杨谷胱甘肽过氧化物酶 *PeGPX* 基因的克隆及转化植株耐盐性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(3): 231-239.
- WANG F F, DING M Q, DENG S R, WANG M J, SUN J, HOU P C, MA X J, ZHANG Y H, ZHAO N, SHEN X, CHEN S L. Cloning of glutathione peroxidase gene *PeGPX* from *Populus euphratica* and the salt tolerance of the transformed plants[J]. Genomics and Applied Biology, 2012, 31(3): 231-239. (in Chinese)
- [23] JIA Q, XIAO Z X, WONG F L, SUN S, LIANG K J, LAM H M. Genome-wide analyses of the soybean f-box gene family in response to salt stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(4): 818.
- [24] GUO Y, ZHAO S, ZHU C, CHANG X, YUE C, WANG Z, LIN Y, LAI Z. Identification of drought-responsive miRNAs and physiological characterization of tea plant (*Camellia sinensis* L.) under drought stress[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 211.
- [25] 赵婷. 不同穗发芽抗性小麦品种种子萌发过程中 miRNAs 的鉴定与比较分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- ZHANG T. Identification and comparative analysis of miRNAs during seed germination of wheat varieties with different pre-harvest sprouting resistance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [26] MA C, BURD S, LERS A. miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2015, 84(1): 169-87.
- [27] 战明慧. 苹果 LysM 类受体激酶基因 *MdLYK15* 对腐皮镰孢菌的响应和表达调控研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022. (in Chinese)
- ZHAN M H. Functional analysis and transcriptional regulation of apple LysM receptor-like kinase gene *MdLYK15* in response to *Fusarium solani*[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2022. (in Chinese)
- [28] LI Y, WANG L, YU B, GUO J, ZHAO Y, ZHU Y. Expression analysis of AUX/IAA family genes in apple under salt stress[J]. Biochemical Genetics, 2022, 60(4): 1205-1221.