果 树 学 报 2025,42(12):2828-2840
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250225

ALA缓解酸枣NaCl胁迫相关miRNAs鉴定及靶基因分析

朱春梅,常心怡,刘志宇,赵宝龙,孙军利*

(石河子大学农学院·新疆生产建设兵团色果蔬栽培生理与种质资源利用重点实验室,新疆石河子 832003)

摘 要:【目的】鉴定5-氨基乙酰丙酸(ALA)缓解酸枣NaCl胁迫相关miRNAs,为阐明miRNA及核心靶基因参与ALA缓解NaCl胁迫的分子机制提供理论依据。**【方法】**以酸枣水培幼苗为试验材料,设置叶面喷施蒸馏水为对照(CK)、叶面喷施ALA处理(ALA)、营养液中添加NaCl溶液和叶面喷施蒸馏水(NaCl)及营养液中添加NaCl溶液和叶面喷施ALA(ALA+NaCl)4个处理,进行高通量测序,鉴定了响应ALA缓解酸枣NaCl胁迫过程的miRNAs及靶基因。**【结果】**从4个处理共12个文库中分析鉴定到149个已知的miRNA(属于31个miRNA家族)和11个novel miRNA。许多响应盐胁迫的miRNAs,如zju-miR172d、zju-miR395i和zju-miR172a均显著下调,表明这些miRNAs可能受单一盐胁迫抑制。进一步分析发现,ALA显著抑制了zju-miR408a的表达。对zju-miR408a的靶基因进行注释,结果为过氧化物酶、原卟啉原氧化酶、线粒体、木质素形成阴离子过氧化物酶、钙依赖性蛋白激酶1、漆酶等。qRT-PCR分析结果与测序结果基本一致。**【结论】**ALA通过抑制zju-miR408a的表达上调靶基因*POD*的表达量达到清除活性氧的目的,从而提高酸枣的耐盐性。该结果为更全面地解析ALA缓解酸枣盐胁迫的miRNA提供了新的信息。

关键词:酸枣;盐胁迫;miRNA;5-氨基乙酰丙酸

中图分类号:S665.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2025)12-2828-13

Identification and target gene analysis of miRNAs related to NACl stress alleviated by ALA in wild jujube

ZHU Chunmei, CHANG Xinyi, LIU Zhiyu, ZHAO Baolong, SUN Junli*

(Agriculture College of Shihezi University/Key Laboratory of Special Fruits & Vegetables Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization, Xinjiang Production and Construction Crop, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract:【Objective】The objective of this study was to identify miRNAs related to the alleviation of NaCl stress in wild jujube by ALA (5-aminolevulinic acid), thereby providing a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism by which miRNAs and core target genes participate in the alleviation of NaCl stress by ALA.【Methods】The leaves of plantlets propagated by tissue culture of wild jujube (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*) were used as the research materials. Four treatments were set up: spraying distilled water on the leaf surface as the control (CK), spraying ALA on the leaf surface (ALA), adding NaCl solution and spraying distilled water on the leaf surface (NaCl), and adding NaCl solution and spraying ALA on the leaf surface (ALA+NaCl). The differences in physiological indicators such as plant height, root length, root surface area, and root volume were measured and analyzed. High-throughput sequencing was performed of the leaves of the four treatments to identify key miRNAs responding to ALA alleviating NaCl stress in wild jujube seedlings, and to determine the functions of their target genes.【Results】The study showed that NaCl treatment led to water lost and wilt of the seedling leaves, significantly reduced the plant height, root length, root surface area, and root volume of wild jujube seedlings. The damage caused by NaCl stress to jujube seedlings was alleviated after exogenous applica-

收稿日期:2025-04-30 **接受日期:**2025-06-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31460495、32560698);兵团"三农"骨干人才培养项目

作者简介:朱春梅,女,在读博士研究生,研究方向:果树栽培生理。E-mail:1746294663@qq.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:1530322722@qq.com

tion of ALA. Twelve sRNA libraries were constructed from the leaves of the four treatments, and the Q30 value of each sample was ≥ 93%, with the reads aligned to genes accounting for 86.46%−93.12% of the total reads, indicating good data quality. A total of 149 known miRNAs belonging to 31 miRNA families and 11 novel miRNAs were identified from the 12 libraries. The length of sRNAs was mainly between 21−24 nt, with 24 nt sRNAs being the most abundant in all libraries. Compared with the CK, there were 152 differentially expressed miRNAs in the NaCl treatment group, including 76 down-regulated genes and 76 up-regulated genes; in the ALA+NaCl treatment group, there were 149 differentially expressed miRNAs, including 78 down-regulated genes and 71 up-regulated genes. The functional enrichment analysis of differentially expressed miRNAs based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database showed that the target genes of differentially expressed miRNAs were involved in metabolic pathways such as TMV resistance proteins, membrane proteins containing SPX domains, sodium-potassium transporters, ribosomal RNA processing proteins, transcription factors such as auxin response factors (ARF) family, MYB transcription factors, WRKY transcription factors. Many miRNAs responding to salt stress, such as zju-miR172d, zju-miR395i, and zju-miR172a, were significantly down-regulated, indicating that these miRNAs might be inhibited by single salt stress. Further analysis revealed that ALA significantly inhibited the expression of zju-miR408a. The target gene annotation of zju-miR408a showed that it targeted enzymes such as the peroxidase, protoporphyrinogen oxidase, mitochondrial anion peroxidase, lignin-forming anion peroxidase, calcium-dependent protein kinase 1, and laccase. The qRT-PCR analysis results were basically consistent with sequencing results. The expression level of the target gene *POD* and POD enzyme activity increased more significantly after exogenous application of ALA than after NaCl stress.【Conclusion】The results of this study showed that exogenous application of ALA alone had no significant effect on wild jujube seedlings. The growth of jujube seedlings was inhibited by NaCl stress, and exogenous application of ALA could alleviate NaCl stress in wild jujube seedlings. The construction of sRNA libraries from wild jujube seedlings revealed that ALA significantly induced the expression of zju-miR408a. The target gene annotation analysis of zju-miR408a mainly targeted the enzymes such as oxidases and protoporphyrinogen oxidase. The results were further verified by measuring the expression level of target gene *POD* and POD enzyme activity. In summary, ALA would alleviate NaCl stress in wild jujube seedlings by inhibiting the expression of zju-miR408a to upregulate the expression level of target gene *POD*, thereby scavenging reactive oxygen species and improving salt tolerance. This result would provide new information for a more comprehensive analysis of miRNAs involved in alleviating salt stress in wild jujube by ALA.

Key words: Wild jujube; Salt stress; miRNA; 5-aminolevulinic acid

枣（*Ziziphus jujuba* Mill.）是鼠李科枣属植物，源产于中国，是中国传统特色果品之一，已有 7000 多年的栽培历史[1]。酸枣又名山枣、荆棘、野荆棘等，多处于野生环境条件，作为适应性极强的古生植物，主要分布在我国黄河流域中下游地区[2]。酸枣是中国特有的生态经济型树种，开发潜力大。酸枣仁是重要的药材，酸枣果肉含有多糖、氨基酸、黄酮、维生素等营养元素，具有较高的营养价值[3]。酸枣特有的萌蘖能力和发达的根系，增强了其对环境的适应能力及繁殖能力，对抗旱、水土保持、防风固沙和绿化荒山起到十分重要的作用。此外，酸枣富含抗逆基因，作为枣的优良砧木，与其他枣树嫁接，可发挥自身优良的抗旱耐盐碱、根系深广发达的特性[4]。

5-氨基乙酰丙酸（ALA）是叶绿素、细胞色素、光敏素等重要生物分子的关键合成前体，在植物生长发育中起着重要作用。此外，ALA 通过调节植物的生长状态，提高植物的抗逆性和适应能力[5]，在植物的抗氧化代谢中扮演着非常重要的角色[6]。ALA 处理过的小白菜叶片中抗氧化酶如超氧化物歧化酶（SOD）等的活性升高，同时叶绿素含量和光合速率

也明显升高[7]。此外，研究发现低浓度ALA可促进某些关键抗氧化酶活性的升高，如抗坏血酸过氧化物酶（APX）、SOD和过氧化氢酶（CAT）等的活性，表明低浓度的ALA能够有效地提高植物的抗氧化能力[8]。

microRNA（miRNA）是一类源自真核生物的内源性非编码小分子RNA，长度为18~24个核苷酸。miRNA通常在植物转录后发挥负调控功能[9-10]，主要通过靶基因切割降解或抑制翻译两种方式[11]，在植物的生长发育、非生物胁迫和生物胁迫等生物过程中发挥作用[12]。现有研究表明，在植物对非生物胁迫（如温度[13]、干旱[14]和盐胁迫[15]）的响应过程中，miRNA起着重要调控作用[16]。目前关于提高作物抗逆性的研究主要集中在光合作用、叶绿素合成[7]、抗氧化系统[17-18]和离子吸收[19]方面。然而，关于ALA如何通过miRNA缓解酸枣盐胁迫的研究少有报道。因此，本研究以酸枣组培幼苗为试验材料，设置CK、ALA、NaCl及ALA+NaCl等4个处理。通过miRNA测序，构建12个sRNA文库，鉴定响应盐胁迫的miRNA，解析miRNA及其核心靶基因在ALA缓解盐胁迫中的作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料与处理

以酸枣（*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*）组培幼苗为试验材料。组培苗生根后，选择长势一致的幼苗移至水培盒中培养，温度为28 ℃（昼）/20 ℃（夜），湿度为55%（昼）/85%（夜），光照度12 000 lx，每隔3 d更换一次营养液。长至第6枚叶片完全展开、大小均一的酸枣组培幼苗进行试验，共设置4个处理：（1）叶面喷施蒸馏水（CK）；（2）叶面喷施100 mg·L^{-1} ALA（ALA）；（3）添加150 mmol·L^{-1} NaCl溶液和叶面喷施蒸馏水（NaCl）；（4）添加150 mmol·L^{-1} NaCl溶液和叶面喷施100 mg·L^{-1} ALA（ALA+NaCl）。每个处理3次重复，每个重复15株酸枣苗。为避免盐激效应，以每天50 mmol·L^{-1} NaCl溶液的梯度逐渐增加至150 mmol·L^{-1} NaCl溶液，记为处理的第0天。每个处理重复分别标注为CK-1、CK-2、CK-3、ALA-1、ALA-2、ALA-3、NaCl-1、NaCl-2、NaCl-3、ALA+NaCl-1、ALA+NaCl-2、ALA+NaCl-3。于处理第6天进行一次性取样。将每个重复的15株幼苗叶片混合后，用锡纸包好于−80 ℃冰箱保存。酸枣幼苗具体培养过程、NaCl（150 mmol·L^{-1}）和ALA（100 mg·L^{-1}）所施用的浓度及取样时间均为本课题组前期试验筛选确定的结果[20-21]。

1.2 形态指标和生理生化指标测定

使用游标卡尺从基部测量植株生长量。使用根系扫描仪（Winrhizo Pro，Quebec，Canada）进行扫描获得图像，使用扫描仪配套的WinRHIZO Pro根系结构分析系统分析根系相关指标。POD活性使用微量检测试剂盒（科铭，中国苏州）并按照操作说明进行测定。

1.3 small RNA文库的构建及测序分析

酸枣叶片总RNA提取、RNA的质量和浓度检测由百迈克生物科技有限公司（百迈克生物，中国北京）完成。构建12个small RNA（sRNA）文库，使用Illumina平台测序。

1.4 sRNA注释和miRNA鉴定

对测序获得的原始数据（raw data）进行处理，计算出clean tags的长度分布。使用bowtie [22]将长度筛选后的sRNA定位到参考序列上，分析small RNA在参考序列上的分布情况。使用miRNA预测软件mirdeep2[23]对新miRNA进行分析，预测样品中novel miRNA。

1.5 miRNA差异基因筛选

基于MA-plot法[24-25]计算差异表达基因（DEGs）。每个基因的*P*值再用Q-value进行多重假设检验校正，对于符合差异在2倍以上且Q-value值≤0.001，认为是显著的差异表达基因。

1.6 靶基因功能富集分析

利用TargetFinder软件[26]进行miR408a靶基因预测，通过BLAST软件将预测靶基因序列与GO[27]、KEGG[28]数据库进行比对获得靶基因的注释信息，筛选特定生物学功能的基因。

1.7 差异表达的miRNA及其靶基因的RT-qPCR验证

按照Trizol（Invitrogen，CA，United States）的标准方案，从CK、ALA、NaCl及ALA+NaCl处理后的叶片中提取总RNA。使用PrimeScript™RT reagent Kit（TaKaRa）试剂盒去除gDNA并进行反转录。用于qRT-PCR的基因特异性引物由Vector NTI 10软件设计，以CK处理的叶片作为参考样本，将基因的相对表达量设为1。引物设计序列如表1所示，以*18sRNA*为内参基因，相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计

表 1　qRT-PCR 基因所用引物

Table 1　Sequences of gene for qRT-PCR

基因名称 Gene name	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence
mdm-miR408a	ACACCAATGCACTGCCTCTT	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
POD	ACCATTCATACGCAGGAGAGAT	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
18sRNA	CAAAGCAAGCCTACGCTCTGT	CTATGAAATACGAATGCCCCC

算[29]。

1.8　统计分析

使用 Microsoft Excel 2010、Origins 2018 和 SPSS 19.0（IBM）对试验数据进行统计和多重比较分析。图表中的数据以平均值±标准差表示，不同小写字母代表各处理间的差异显著（$P<0.05$）。

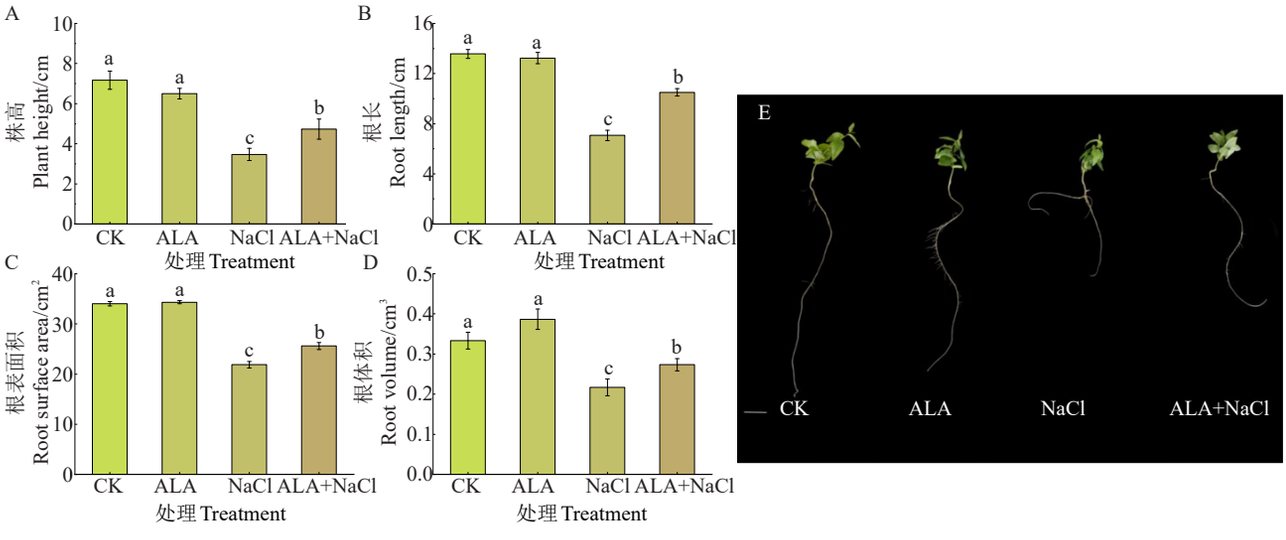
2　结果与分析

2.1　试验处理后酸枣幼苗表型

由图 1-A~D 可知，与 CK 相比，NaCl 处理显著降低了酸枣幼苗的株高、根长、根表面积和根体积（51.63%、47.91%、35.75%和 34.98%），单独外源喷施 ALA 处理对酸枣幼苗地上部生长和根系无显著影响；与 NaCl 处理相比，ALA+NaCl 处理显著提高了酸枣幼苗的株高、根长、根表面积和根体积（36.54%、48.58%、17.07%和 26.12%）。酸枣幼苗处理后形态图（图 1-E）显示，与 CK 相比，外源喷施 ALA 酸枣幼苗的地上部无显著变化，根系侧根增加；NaCl 处理后酸枣幼苗出现失水萎蔫的现象，根系形态受到显著抑制；与单独的 NaCl 处理相比，ALA+NaCl 共同处理可缓解酸枣幼苗所受的损伤。由此可知，NaCl 处理显著抑制了酸枣幼苗的生长和根系形态，外源喷施 ALA 能够显著地缓解 NaCl 胁迫对酸枣幼苗的伤害。

2.2　酸枣 sRNA 文库测序与分析

为了鉴定能够响应盐胁迫的 miRNAs，酸枣 CK、ALA、NaCl 及 ALA+NaCl 4 个处理共构建了 12 个 sRNA 文库，利用 Illumina 平台对文库进行测序分析。在所测 12 个文库中，CK-1、CK-2、CK-3、ALA-1、ALA-2、ALA-3、NaCl-1、NaCl-2、NaCl-3、ALA+NaCl-1、ALA+NaCl-2 和 ALA+NaCl-3 分别产生的 raw reads 为：38.54 M、45.74 M、40.17 M、39.61 M、43.32 M、40.95 M、39.33 M、43.31 M、37.98 M、40.12 M、43.78 M 和 39.86 M。经过杂质的过滤，去除低质量序列和 polyA 序列得到 clean reads 分别为 38.21 M、45.51 M、39.97 M、39.36 M、43.09 M、40.79 M、38.98 M、43.07 M、37.8 M、39.94 M、43.55 M 和 39.45 M。各样品 Q30 均≥ 93%，将所有 clean reads 与参考基因组



拍摄于胁迫处理后第 6 天，标尺为 2 cm。

Photographed on the 6th day after stress treatment, scale bar is 2 cm.

图 1　胁迫处理后酸枣植株生长形态

Fig. 1　Growth pattern of treated wild jujube plants

GCF_000826755.1_ZizJuj_1.1_genomic.fna 进行比对，成功比对到基因的reads占clean reads的比例为86.46%~93.12%，数据质量符合分析要求，可进行后续分析（表2）。

2.3 酸枣叶片miRNAs的鉴定

在这12个文库中，已知的miRNA表达水平也可以通过read content的频率来体现。根据reads content将不同处理组中已知miRNAs的表达水平分为8类：无表达（0 reads）、最低（>0~10 reads）、较低（>10~50 reads）、低（>50~100 reads）、中等（>100~500 reads）、高（>500~1000 reads）、较高（>1000~10 000 reads）和最高（>10 000 reads）。本研究结果显示，大多数文库中属于这8类的已知miRNAs的百分比高度相似。已知microRNA中最低（>0~10 reads）类别分布最多，在不同文库中的比例分别为18.3%、21.71%、23.49%。而在ALA *vs* CK、NaCl *vs* CK、ALA+NaCl *vs* CK中，最高（>10 000 reads）类别所占比例最小，分别为8.5%、8.55%、12.08%（图2-A）。为鉴定酸枣叶片中已知的miRNA，通过对miRBase18.0（http://www.mirbase.org）数据库进行比对，只考虑精确匹配的序列，共鉴定出149个已知miRNA，属于31个miRNA家族。其中，不同家族的miRNA成员数量相似，大多数保守的miRNA家族成员为1~6个。大多数已知miRNA家族都有多个成员，如miR156（26个成员）、miR167（10个成员）、miR171（11个成员）、miR171（11个成员）和miR395（9个成员）（图2-B）。sRNAs的长度主要在21~24nt之间，其中24nt sRNAs在12个文库中最丰富（图2-C）。使用miRdeep2从不同处理的酸枣叶片中鉴定出11个新的miRNA，新miRNA成熟序列的信息见表3，一些novel miRNA的二级结构如图2-D所示。

表2 酸枣叶片测序质量控制

Table 2 Sequencing quality control of sour date leaves

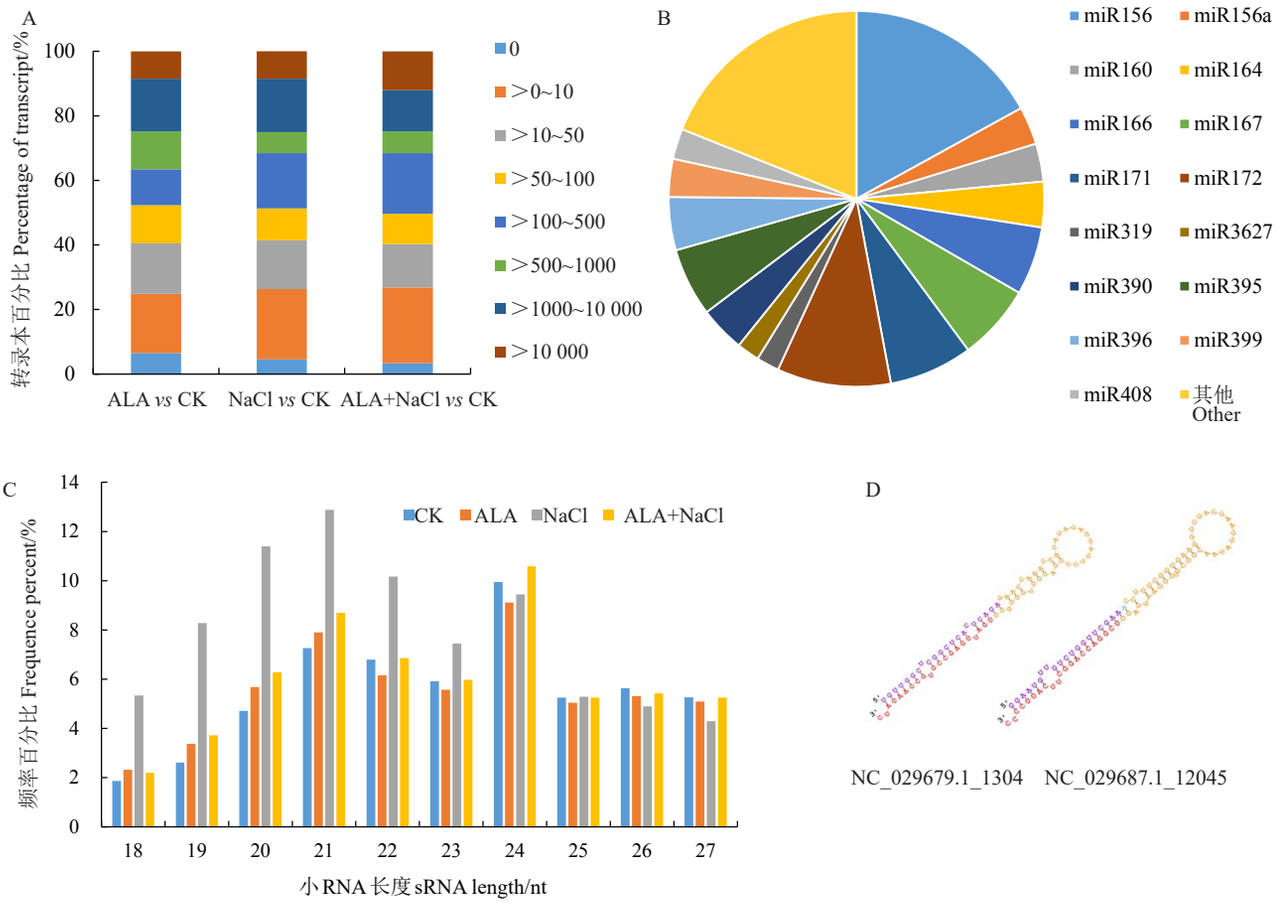
样品名称 Samples name	测序原始数据 Raw_reads	过滤后获得的Clean reads数量 Clean_reads	G/C碱基数占总碱基数量的百分比 GC/%	碱基质量值大于20的比例 Q20/%	碱基质量值大于30的比例 Q30/%	至少一个比对率的读段 Reads with at least one reported alignment
CK-1	38 544 211	38 214 548	41.75	97.46	93.14	7 926 215（92.65%）
CK-2	45 742 283	45 512 838	44.05	97.85	94.01	9 264 103（92.45%）
CK-3	40 179 700	39 967 417	41.58	97.66	93.54	10 748 17（92.13%）
ALA-1	39 613 664	39 356 003	43.28	97.58	93.34	8 277 503（89.20%）
ALA-2	43 316 100	43 088 377	43.75	97.81	93.98	9 556 285（92.02%）
ALA-3	40 948 479	40 790 163	42.42	97.84	94.08	8 915 408（88.76%）
NaCl-1	39 331 915	38 979 318	41.78	97.55	93.46	5 738 839（91.90%）
NaCl-2	43 314 420	43 072 244	42.79	97.72	93.78	9 105 539（91.24%）
NaCl-3	37 980 837	37 799 291	42.83	97.75	93.85	7 459 521（91.38%）
NaCl+ALA-1	40 117 417	39 941 654	42.31	98.04	94.52	8 888 100（89.97%）
NaCl+ALA-2	43 782 672	43 555 391	43.02	97.91	94.16	8 145 625（93.12%）
NaCl+ALA-3	39 855 519	39 454 369	41.41	97.43	93.25	9 864 644（86.46%）

2.4 酸枣叶片中miRNAs表达定量分析

对各样本中已知和新miRNA进行表达量的统计，并用TPM进行表达量归一化处理。miRNA表达的分布描述了每个样品中总体miRNA表达模式。在每个样本中，miRNA的$\log_{10}$（TPM）+1主要在1~3之间（图3-A~C）。每个样品中TPM密度的分布如图3-D~F所示。样品3次重复中miRNA的表达水平趋于一致，表明生物学重现性是可靠的。

2.5 差异miRNA分析

为鉴定CK、ALA、NaCl和ALA+NaCl处理组中差异表达的miRNAs，笔者对miRNAs的差异表达模式进行层次聚类分析和统计学比较分析。结果表明，与CK相比，ALA处理组中有153个miRNA差异表达，包括94个下调基因和59个上调基因；NaCl组中有152个miRNA差异表达，包括76个下调基因和76个上调基因；ALA+NaCl组中有149个miRNA差异表达，包括78个下调基因和71个上调基因（表4）。许多响应盐胁迫的miRNAs，如zju-miR172d、zju-miR395i和zju-miR172a均显著下调，表明这些miRNAs可能受盐胁迫抑制。进一步分析发现，ALA显著诱导zju-miR391表达，并抑制zju-miR408a、zju-miR398b的表达，进一步证明了miRNA在ALA缓解盐胁迫调控作用中的复杂性（图4）。



A. 酸枣叶片中 read content 频率；B. 酸枣叶片中 miRNA 家族分布；C. 酸枣叶片中 miRNA 序列长度分布；D. 酸枣叶片中鉴定的 novel miRNA 二级结构。

A. Frequency of read content in wild jujube leaves; B. Distribution of miRNA families in wild jujube leaves; C. Distribution of miRNA sequence length in wild jujube leaves; D. Secondary structure of novel miRNAs identified in wild jujube leaves.

图 2　酸枣叶片中 miRNA 家族鉴定

Fig. 2　Identification of miRNA families in wild jujube leaves

表 3　酸枣叶片中鉴定的新 miRNAs

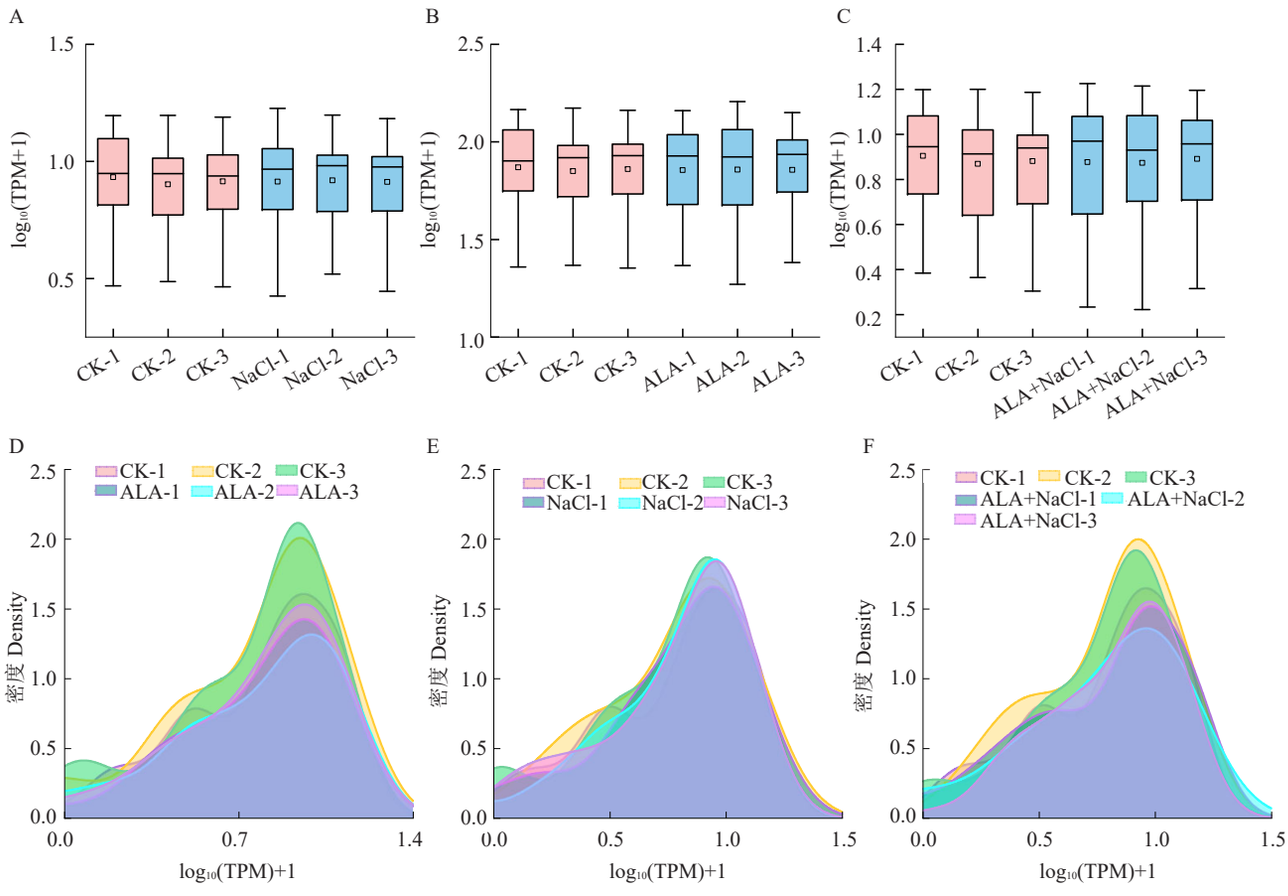
Table 3　Novel miRNAs identified in sour date leaves

miRNA ID	成熟序列 Mature sequence
NC_029687.1_12045	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
NC_029683.1_6921	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
NC_029683.1_6845	GCTCTCTATGCTTCTGCCATC
NC_029689.1_13981	CGAAGCCCGGAGGAAGAGTGG
NC_029679.1_1657	TGACAGAAGAGAGTGAGCACT
NC_029679.1_1304	TGATTGAGCCGTGCCAATATC
NW_015453786.1_19618	CGATGTTGGTGAGGTTCAATC
NW_015453517.1_18014	CGCACGCTAGCGGGGAACCATC
NC_029687.1_12581	ACTTCCTTCTGCTAAGCTATCACC
NW_015453676.1_19118	TTTGGACTGAAGGGAGCTCC
NC_029689.1_14667	GTGTGTGTCTTGACTGTTGAGAGC

2.6　差异基因功能富集分析及响应 NaCl 胁迫的 miRNA408a 靶基因预测

差异 miRNA 靶基因进行 GO 富集分析，结果表明，miRNA 靶基因参与多种生物学过程，包括生物调节、细胞过程、代谢过程、信号转导和其他生物学过程。此外，miRNAs 靶基因涉及分子功能包括转录因子活性和催化活性。KEGG 数据库分析发现，靶基因参与了代谢、遗传信息过程、组织系统、环境信息过程和细胞过程 5 个不同的功能。在这些靶基因中，发现了与其他代谢途径有关的靶基因，包括 TMV 抗性蛋白、含 SPX 结构域的膜蛋白、钠钾转运蛋白、核糖体 RNA 处理蛋白的转录因子，如生长素应答因子（ARF）家族、MYB 转录因子、WRKY 转录因子（图 5）。

对差异表达 miRNA 分析发现，无论是否经过 NaCl 胁迫处理，ALA 处理均能显著下调 zju-miR408a 的表达水平。这表明酸枣 zju-miR408a 可能参与了 ALA 介导的缓解 NaCl 胁迫的过程。为进



A~C. 每个样品中 miRNA 表达总体分布；D~F. TPM 密度的分布。

A-C. The overall distribution of miRNA expression in each sample; D-F. Distribution of TPM density.

图 3 每个样品中的 miRNA 表达状态

Fig. 3 miRNA expression status in each sample

表 4 叶片差异 miRNA 数量统计

Table 4 Number statistics of differential miRNA in leaves

处理 Treatment	上调基因数 Number of up-regulated gene	下调基因数 Number of down-regulated gene	总数 Total
CK *vs* ALA	59	94	153
CS *vs* NaCl	76	76	152
CK *vs* ALA+NaCl	71	78	149

一步了解 miR408a 在 NaCl 胁迫中的功能，对 zju-miR408 进行靶基因预测（表 5），发现酸枣中 zju-miR408a 靶基因并不相同，zju-miR408a 的靶基因包括 TMV 抗性蛋白 N 样、原卟啉原氧化酶，线粒体、过氧化物酶 4、木质素形成阴离子过氧化物酶、钙依赖性蛋白激酶 1、漆酶和过氧化物酶等。因此，笔者推测 ALA 通过介导 zju-miR408a 对 POD 活性进行调控，增强植物耐盐性，从而缓解 NaCl 胁迫的影响。

2.7 酸枣叶片 POD 酶活性及 zju-miRNA408a 和靶基因 qRT-PCR 验证

为验证测序结果中 zju-miRNA408a 对 ALA 和 NaCl 胁迫的动态响应在生物学层面的一致性，本研究采用 qRT-PCR 技术分析了 ALA 处理及 NaCl 胁迫条件下该 miRNA 的表达水平。测序数据与 qRT-PCR 结果呈现出高度一致的表达变化趋势，证实了 miRNA-Seq 检测结果的可靠性，且与预期试验假设完全吻合（图 6）。靶基因 *POD* 的表达量及 POD 酶活性进一步证实了 ALA 可能通过下调 zju-miRNA408a 的表达来上调 *POD* 基因的表达量从而提高 POD 酶活性来增强酸枣耐盐能力。

3 讨 论

盐胁迫是一种在自然环境中广泛存在的非生物

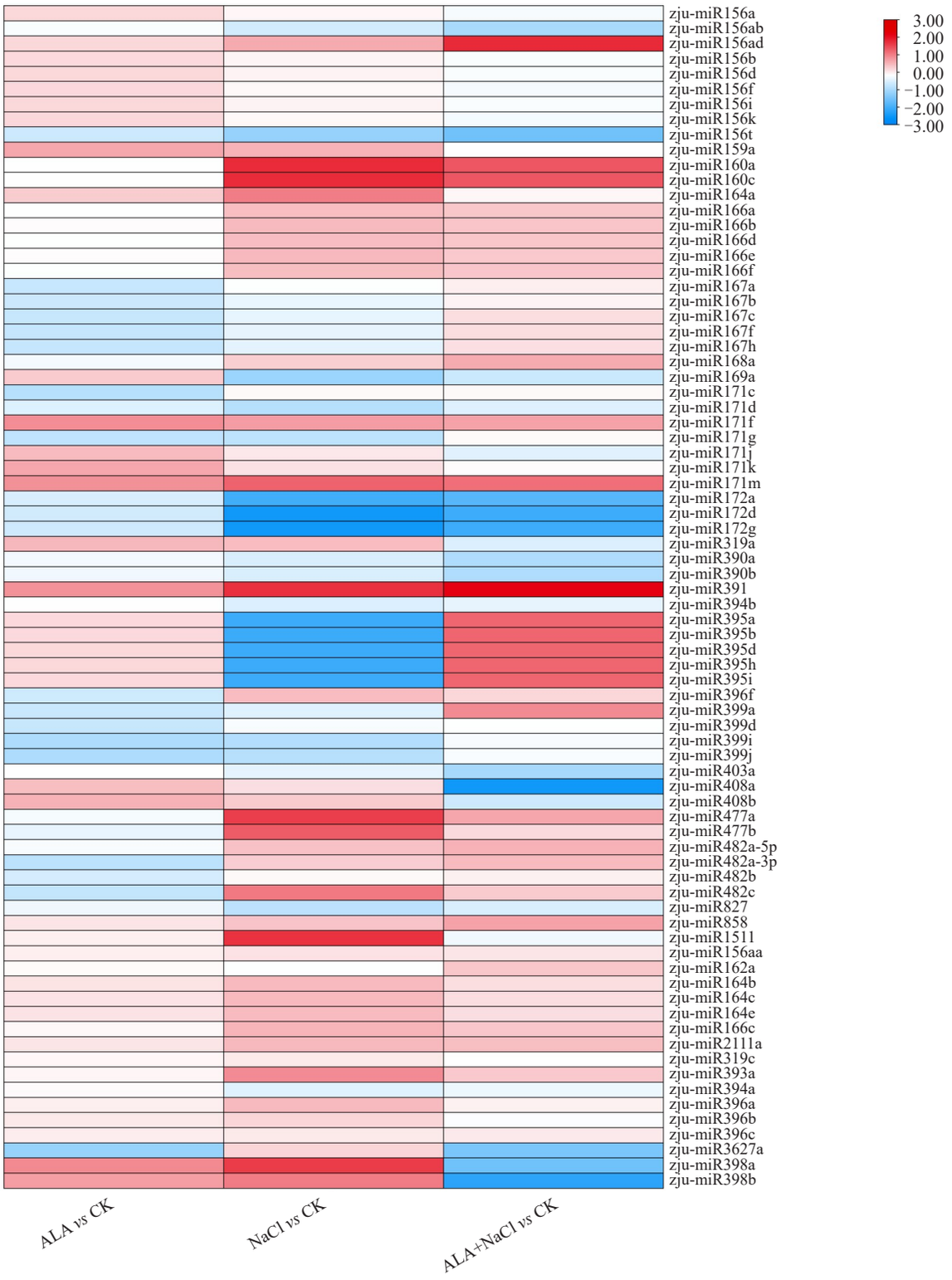
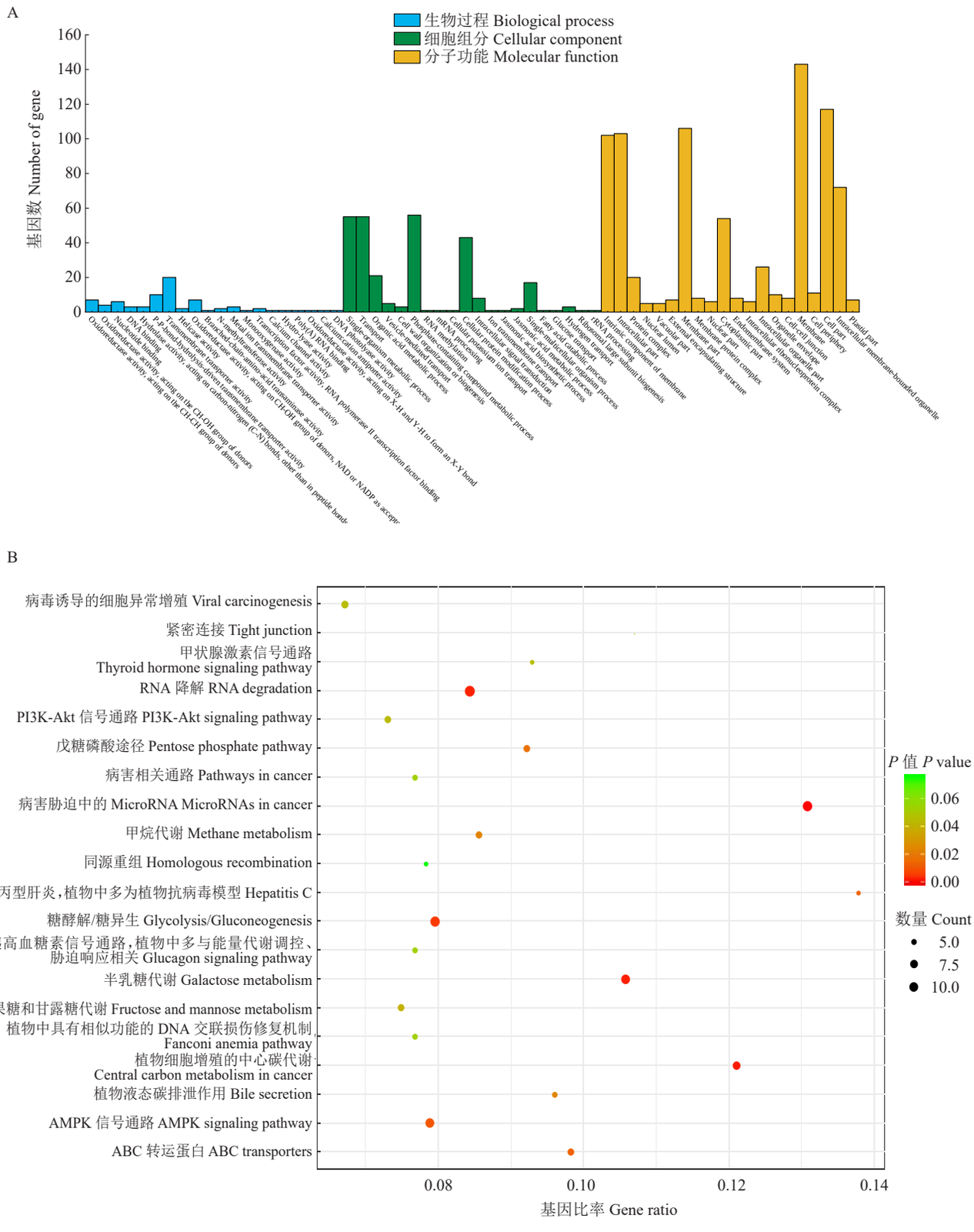


图 4　酸枣叶片中各比较组中差异 miRNA 的表达水平

Fig. 4　Expression levels of differential miRNAs in each comparative group in leaves of wild jujube leaves

胁迫形式。由于不合理的灌溉、施肥和气候变化，受盐胁迫影响的土地面积正在增加。长期的盐胁迫会抑制植物生长，降低作物产量，最终降低农产品的经济效益和土地利用效率[30]。幼苗期作为植物生长发育的起点，盐胁迫对其的影响程度决定了植物能否顺利度过苗期。周琦等[31]研究发现鹅耳枥在盐胁迫下随着盐浓度的增加，生长势受到抑制，这一结果与施娴等[32]和于伟[33]的研究结果一致，表明酸枣在盐



A. GO 富集分析;B. KEGG 富集分析。

A. GO enrichment analysis; B. KEGG enrichment analysis.

图 5 zju-miR408a 靶基因富集分析

Fig. 5 zju-miR408a target gene enrichment analysis

表 5　zju-miR408a 靶基因预测结果

Table 5　zju-miR408a target gene prediction results

基因 ID Gene ID	注释结果 Annotation results
LOC107403307	TMV 抗性蛋白 N 样 TMV resistance protein N-like
LOC107404868	原卟啉原氧化酶，线粒体 Protoporphyrinogen oxidase, mitochondrial
LOC107405097	过氧化物酶 4 Peroxidase 4
LOC107405832	木质素形成阴离子过氧化物酶 Lignin-forming anionic peroxidase
LOC107406893	Tubby 样 F-box 蛋白 8 Tubby-like F-box protein 8
LOC107407356	谷胱甘肽-C9 Glutaredoxin-C9
LOC107407364	可能的转录因子 WRKY 51 Probable WRKY transcription factor 51
LOC107408008	转录因子 MYB3R-1 Transcription factor MYB3R-1
LOC107410427	La 相关蛋白 1A La-related protein 1A
LOC107410617	*L*-抗坏血酸氧化酶同源物 *L*-ascorbate oxidase homolog
LOC107410668	过氧化物酶 P7 Peroxidase P7
LOC107411129	可能的 LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 At5g45780 Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g45780
LOC107412498	F-box/kelch-repeat 蛋白 At3g06240 F-box/kelch-repeat protein At3g06240-like
LOC107415375	钾转运蛋白 8 Potassium transporter 8
LOC107415564	依赖 ATP 的锌金属蛋白酶 FTSH 6，叶绿体 ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 6, chloroplastic
LOC107416117	双孔钾通道 3 Two-pore potassium channel 3
LOC107416183	ALA-相互作用亚基 1 ALA-interacting subunit 1
LOC107417746	过氧化物酶 47 Peroxidase 47
LOC107419839	过氧化氢酶同工酶 1 Catalase isozyme 1
LOC107421706	NAD 依赖性苹果酸酶 62 kDa 同工酶，线粒体 NAD-dependent malic enzyme 62 kDa isoform, mitochondrial
LOC107423464	F-box 蛋白 SKP2A F-box protein SKP2A
LOC107425191	钙调蛋白结合转录激活因子 3 Calmodulin-binding transcription activator 3
LOC107426494	LRR 类受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RGI2 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RGI2
LOC107426842	钠转运体 HKT1 Sodium transporter HKT1
LOC107427104	F-box 蛋白 At1g10780 F-box protein At1g10780
LOC107429130	热休克蛋白 90-5，叶绿体 Heat shock protein 90-5, chloroplastic
LOC107430444	钙依赖性蛋白激酶 1 Calcium-dependent protein kinase 1
LOC107430555	漆酶 17 Laccase-17-like
LOC107430628	漆酶 2 Laccase-2
LOC107431265	过氧化物酶 P7 Peroxidase P7
LOC107431646	NADPH 依赖性硫氧还原酶 3 NADPH-dependent thioredoxin reductase 3
LOC107431819	过氧化物酶体脂肪酸 *β*-氧化多功能蛋白 AIM1 Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein AIM1
LOC107432145	LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 FEI 1 LRR receptor-like serine/threonine protein kinase FEI 1
LOC107433279	谷胱甘肽 *S* 转移酶 F13 Glutathione *S*-transferase F13
LOC107434080	抗病蛋白 RUN1 Disease resistance protein RUN1
LOC107434313	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase
LOC107435508	可能的转录因子 WRKY20 Probable WRKY transcription factor 20

胁迫下生长受到抑制，在喷施 ALA 后抑制作用得到缓解。

miRNA 及其靶基因在植物抵御盐胁迫过程中可通过调控种子的萌发、根系生长的改变、生长周期变化、活性氧清除等过程，缓解胁迫对植物的损伤[34]。植物体内叶绿素生物合成的前体物质是 ALA，外源施加 ALA 可以提高植物抗氧化能力，降低膜脂过氧化的损害程度，提高植物对非生物胁迫的抵抗能力[35]。Kanto 等[36]推测 5-ALA 可作为抗氧化酶活性的启动子，促进抗氧化酶活性升高。在本试验中，ALA 处理后酸枣幼苗叶片的 POD 酶活性均高于 CK，外源喷施 ALA 后可进一步提高酸枣幼苗叶片的 POD 酶活性，这与王亚新等[37]的研究结果一致。ALA 还可以提高植物保护酶活性，减轻膜脂质

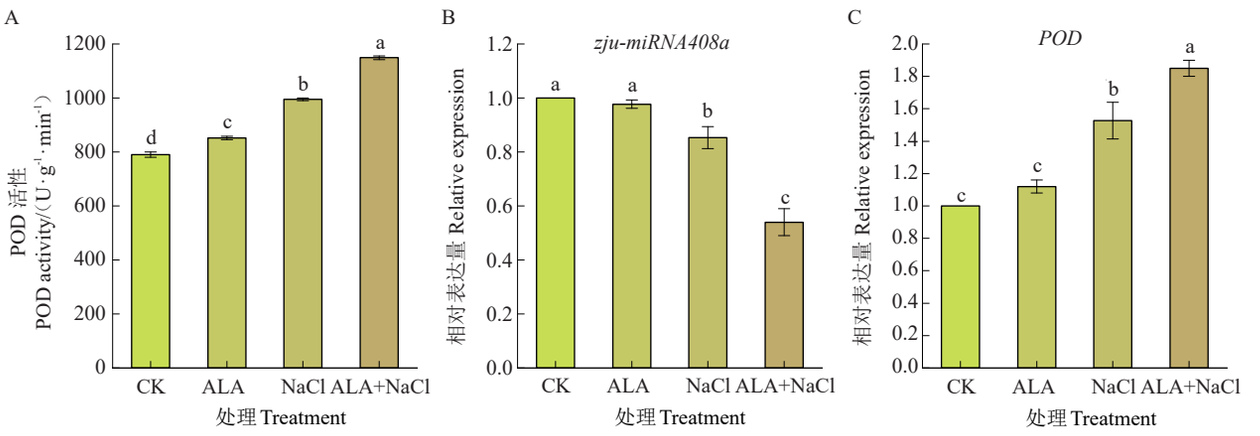


图 6 酸枣叶片 POD 酶活性（A）和 zju-miRNA408a（B）、靶基因 *POD*（C）的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 POD enzyme activity (A) and qRT-PCR validation of zju-miRNA408a (B), target genes *POD* (C) in wild jujube leaves

过氧化程度，保持膜系统的完整性，增强植株抵御逆境的能力。

本研究探讨了 ALA 通过调控 miRNAs 表达在增强酸枣盐胁迫耐受性中的潜在作用。对以 CK、ALA 处理、NaCl 处理和 ALA+NaCl 处理的试验材料测定了 miRNA 的表达情况，鉴定出 149 个已知 miRNA（属于 31 个 miRNA 家族）和 11 个预测的 novel miRNA。获得的这些 miRNAs 的序列符合 miRNAs 的二级结构标准。12 个文库中 sRNAs 的长度主要在 21~24nt 之间，其中 24nt sRNAs 在 12 个文库中最丰富，推测他们可能在盐胁迫缓解效应中发挥关键作用。通过更深入地研究 sRNA 转录组，发现 sRNA 的大小分布与已发表的植物非常相似，如拟南芥[38]，辣椒[39]和三叶橙[40]，比例最高的是 21-24nt sRNA。此外，已知的 149 个 miRNA 属于 31 个保守 miRNA 家族，这些 miRNAs 广泛分布于双子和单子叶植物中[41]。这些已知的 miRNAs 家族成员不止一个，如 miR156（26 个成员）、miR167（10 个成员）miR171（11 个成员）和 miR395（9 个成员）。

miRNA 主要通过抑制靶基因的翻译或者对靶基因特异性切割来行使其功能。miR408 是一类高度保守、古老的基因家族，在植物应对非生物胁迫时发挥着重要的作用[42]。现有研究中，miR408 主要靶向车前花青素、漆酶（LAC）、*AFG1* 和 *TaCLP1* 等合成基因[43]。研究表明，拟南芥中，*AGO1* 和 *AGO2* 参与调控 miR408 介导的花青素合成[44]；在蒺藜状苜蓿中 miR408 靶向质体蓝素蛋白响应水分胁迫[45]。笔者发现 ALA 显著抑制了 zju-miR408a 的表达，以酸枣转录组 unigene 为靶标预测的数据库，预测到酸枣 zju-miR408 家族的靶基因包括原卟啉原氧化酶、过氧化物酶 4 和漆酶等。qPCR 结果也显示，zju-miR408a 和靶基因在 4 个处理中的表达量均有显著差异。因此，笔者推测 ALA 可能通过抑制 zju-miR408a 的表达来正向调控 POD 活性，从而增强植物对盐胁迫的耐受性。该研究结果为进一步解析酸枣 miR408 在盐胁迫缓解中的功能机制奠定了基础。

4 结 论

笔者在本研究中使用高通量测序构建了不同处理（对照、ALA、NaCl 和 ALA+NaCl）下酸枣叶片的小 RNA 文库。对文库数据分析，鉴定到 149 个已知的 miRNA 和 11 个新的 miRNA。许多响应盐胁迫的 miRNA，如 zju-miR172d、zju-miR395i 和 zju-miR172a，表达显著下调，表明它们可能被盐胁迫抑制。进一步分析发现，ALA 显著抑制了 zju-miR408a 的表达，其靶基因主要包括过氧化物酶和原卟啉原氧化酶。基于酸枣叶片 POD 酶活性、zju-miRNA408a 及其靶基因 *POD* 的 qRT-PCR 验证结果，表明 ALA 通过下调 zju-miR408a 表达来提高 POD 酶活性，进而清除活性氧（ROS），最终增强酸枣的盐胁迫耐受性。

参考文献 References：

[1] 刘凤之，王海波，李莉，宣景宏 . 我国设施果树产业现状、存在问题与发展对策[J]. 中国果树，2021(11)：1-4.
LIU Fengzhi，WANG Haibo，LI Li，XUAN Jinghong. Current situation，issue and suggestion of the protected fruit industry in China[J]. China Fruits，2021(11)：1-4.

[2] 李会军，李萍，余国奠 . 酸枣的研究进展及开发前景[J]. 中国野生植物资源，1999，18(3)：15-19.
LI Huijun，LI Ping，YU Guodian. Advance of research and prospect of development of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H F Chow[J]. Chinese Wild Plant Resources，1999，18(3)：15-19.

[3] 马进杰，刘萍，马百平 . 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志，2011，38(3)：206-211.
MA Jinjie，LIU Ping，MA Baiping. The chemical constituents of Semen Zizyphi Spinosae and pharmacologic mechanism of its sedative and hypnotic effects：Research advances[J]. Journal of International Pharmaceutical Research，2011，38(3)：206-211.

[4] 赵天娇 . 圣冠枣接穗对酸枣实生砧木根系生长及生理特性的影响[D]. 长沙：中南林业科技大学，2022.
ZHAO Tianjiao. Scion of *Ziziphus spina- christi* effects on growth and physiological characteristics of seedling stock roots in *Ziziphus acidojujuba*[D]. Changsha：Central South University of Forestry & Technology，2022.

[5] WU Y，LIAO W B，DAWUDA M M，HU L L，YU J H. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants：A review[J]. Plant Growth Regulation，2019，87(2)：357-374.

[6] AKRAM N A，ASHRAF M，AL-QURAINY F. Aminolevulinic acid-induced changes in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants under saline regimes[J]. Scientia Horticulturae，2012，142：143-148.

[7] MEMON S A，HOU X L，WANG L J，LI Y. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll，antioxidative enzymes and photosynthesis of pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee)[J]. Acta Physiologiae Plantarum，2009，31(1)：51-57.

[8] XU F，CHANG J，CHENG S Y，ZHU J，LI L L，WANG Y，CHENG H. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the antioxidant system in *Ginkgo biloba* leaves[J]. African Journal of Biotechnology，2009，8(16)：3769-3776.

[9] BARTEL D P. MicroRNAs：Genomics，biogenesis，mechanism，and function[J]. Cell，2004，116(2)：281-297.

[10] VOINNET O. Origin，biogenesis，and activity of plant microRNAs[J]. Cell，2009，136(4)：669-687.

[11] ZHANG B H. MicroRNA：A new target for improving plant tolerance to abiotic stress[J]. Journal of Experimental Botany，2015，66(7)：1749-1761.

[12] SUNKAR R，LI Y F，JAGADEESWARAN G. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. Trends in Plant Science，2012，17(4)：196-203.

[13] JYOTHI M N，RAI D V，NAGESH BABU R. Identification and characterization of high temperature stress responsive novel miRNAs in French bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2015，176(3)：835-849.

[14] BARRERA-FIGUEROA B E，GAO L，DIOP N N，WU Z G，EHLERS J D，ROBERTS P A，CLOSE T J，ZHU J K，LIU R Y. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes[J]. BMC Plant Biology，2011，11：127.

[15] LIU H H，TIAN X，LI Y J，WU C G，ZHENG C C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. RNA，2008，14(5)：836-843.

[16] 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.

[17] NISHIHARA E，KONDO K，PARVEZ M M，TAKAHASHI K，WATANABE K，TANAKA K. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*) [J]. Journal of Plant Physiology，2003，160(9)：1085-1091.

[18] SUN Y P，ZHANG Z P，WANG L J. Promotion of 5-aminolevulinic acid treatment on leaf photosynthesis is related with increase of antioxidant enzyme activity in watermelon seedlings grown under shade condition[J]. Photosynthetica，2009，47(3)：347-354.

[19] NAEEM M S，RASHEED M，LIU D，JIN Z L，MING D F，YONEYAMA K，TAKEUCHI Y，ZHOU W J. 5-Aminolevulinic acid ameliorates salinity-induced metabolic，water-related and biochemical changes in *Brassica napus* L.[J]. Acta Physiologiae Plantarum，2011，33(2)：517-528.

[20] 常心怡，孙军利，赵宝龙，李芳芳，刘连玲，何旺 . 外源 ALA 对 NaCl 胁迫下酸枣幼苗光合特性与膜脂过氧化的影响[J]. 新疆农业科学，2019，56(9)：1635-1644.
CHANG Xinyi，SUN Junli，ZHAO Baolong，LI Fangfang，LIU Lianling，HE Wang. Effects of exogenous ALA on photosynthesis and membrane peroxidation in the leaves of jujube seedlings under NaCl treatment[J]. Xinjiang Agricultural Sciences，2019，56(9)：1635-1644.

[21] ZHU C M，LIU Z Y，CHANG X Y，ZHANG Z J，SHI W C，ZHANG Z R，ZHAO B L，SUN J L. Analysis of the alternative splicing events of exogenous *δ*-aminolevulinic acid under NaCl stress in wild jujube seedlings[J]. Forests，2022，13(12)：2076.

[22] LANGMEAD B，TRAPNELL C，POP M，SALZBERG S L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. Genome Biology，2009，10(3)：R25.

[23] FRIEDLÄNDER M R，MACKOWIAK S D，LI N，CHEN W，RAJEWSKY N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. Nucleic Acids Research，2012，40(1)：37-52.

[24] WANG L K，FENG Z X，WANG X，WANG X W，ZHANG X G. DEGseq：An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. Bioinformatics，2010，26(1)：136-138.

[25] YANG Y H，DUDOIT S，LUU P，LIN D M，PENG V，NGAI J，

SPEED T P. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(4): e15.

[26] ALLEN E, XIE Z X, GUSTAFSON A M, CARRINGTON J C. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants[J]. Cell, 2005, 121(2): 207-221.

[27] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY J M, DAVIS A P, DOLINSKI K, DWIGHT S S, EPPIG J T, HARRIS M A, HILL D P, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE J C, RICHARDSON J E, RINGWALD M, RUBIN G M, SHERLOCK G. Gene Ontology: Tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.

[28] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, OKUNO Y, HATTORI M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(Database issue): D277-D280.

[29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[30] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[31] 周琦, 祝遵凌, 施曼 . 盐胁迫对鹅耳枥生长及生理生化特性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(6): 56-60.
ZHOU Qi, ZHU Zunling, SHI Man. Effects of salt stress on growth, physiological and biochemical characteristics of *Carpinus turczaninowii* seedlings[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2015, 39(6): 56-60.

[32] 施娴, 李洪有, 卢丙越, 周云, 赵继菊, 赵孟丽, 梁京, 孟衡玲 . 3个苦荞品种对盐胁迫的生理响应及耐受性评价[J]. 作物杂志, 2022(3): 149-154.
SHI Xian, LI Hongyou, LU Bingyue, ZHOU Yun, ZHAO Jiju, ZHAO Mengli, LIANG Jing, MENG Hengling. Physiological responses of three tartary buckwheat varieties to salt stress and evaluation of salt tolerance[J]. Crops, 2022(3): 149-154.

[33] 于伟 . 水杨酸和亚精胺缓解茄子幼苗盐胁迫的生理机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
YU Wei. Physiological mechanism of SA and Spd alleviating salt stress in eggplant seedling (*Solaunm melongena* L.) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.

[33] 刘晓威, 杨秀艳, 刘正祥, 武海雯, 张华新, 朱建峰 . MicroRNA在植物抵御盐胁迫过程中的作用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 12-21.
LIU Xiaowei, YANG Xiuyan, LIU Zhengxiang, WU Haiwen, ZHANG Huaxin, ZHU Jianfeng. Role of microRNA in plant resistance to salt stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(12): 12-21.

[35] HE S S, YANG H, CAO R Q, TANG Q, AN Y Y, WANG L J. 5-Aminolevulinic acid-induced salt tolerance in strawberry (cv. 'Benihoppe'): Possible role of nitric oxide on interception of salt ions in roots[J]. Scientia Horticulturae, 2022, 304: 111294.

[36] KANTO U, JUTAMANEE K, OSOTSAPAR Y, CHAI-ARREE W, JATTUPORNPONG S. Promotive effect of priming with 5-aminolevulinic acid on seed germination capacity, seedling growth and antioxidant enzyme activity in rice subjected to accelerated ageing treatment[J]. Plant Production Science, 2015, 18(4): 443-454.

[37] 王亚新, 冯乃杰, 赵黎明, 郑殿峰, 沈雪峰, 刘美玲, 杜有为 . 植物生长调节剂与氮肥对盐胁迫下水稻幼苗生理特性的影响[J]. 核农学报, 2024, 38(3): 561-573.
WANG Yaxin, FENG Naijie, ZHAO Liming, ZHENG Dianfeng, SHEN Xuefeng, LIU Meiling, DU Youwei. Effects of plant growth regulators and nitrogen fertiliser on the physiological characteristics of rice seedlings under salt stress[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2024, 38(3): 561-573.

[38] JATAN R, CHAUHAN P S, LATA C. High-throughput sequencing and expression analysis suggest the involvement of *Pseudomonas putida* RA-responsive microRNAs in growth and development of *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(15): 5468.

[39] HWANG D G, PARK J H, LIM J Y, KIM D, CHOI Y, KIM S, REEVES G, YEOM S I, LEE J S, PARK M, KIM S, CHOI I Y, CHOI D, SHIN C. The hot pepper (*Capsicum annuum*) microRNA transcriptome reveals novel and conserved targets: A foundation for understanding microRNA functional roles in hot pepper[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64238.

[40] SONG C N, WANG C, ZHANG C Q, KORIR N K, YU H P, MA Z Q, FANG J G. Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliate orange (*Citrus trifoliata*)[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 431.

[41] LIN S, SANTI C, JOBET E, LACUT E, EL KHOLTI N, KARLOWSKI W M, VERDEIL J L, BREITLER J C, PÉRIN C, KO S S, GUIDERDONI E, CHIOU T J, ECHEVERRIA M. Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation[J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(12): 2119-2131.

[42] AXTELL M J, BOWMAN J L. Evolution of plant microRNAs and their targets[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(7): 343-349.

[43] ZHAO X Y, HONG P, WU J Y, CHEN X B, YE X G, PAN Y Y, WANG J, ZHANG X S. The tae-miR408-mediated control of *TaTOC1* genes transcription is required for the regulation of heading time in wheat[J]. Plant Physiology, 2016, 170(3): 1578-1594.

[44] MAUNOURY N, VAUCHERET H. *AGO1* and *AGO2* act redundantly in miR408-mediated plantacyanin regulation[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28729.

[45] TRINDADE I, CAPITÃO C, DALMAY T, FEVEREIRO M P, DOS SANTOS D M. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*[J]. Planta, 2010, 231(3): 705-716.