

# 光皮桦 miR164 及其靶基因 *NAC1* 在低氮胁迫中的表达分析

吴骏, 张俊红, 黄蒙慧, 朱敏慧, 童再康

浙江农林大学, 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300

**摘要:** 氮是植物生长发育所必需的大量营养元素, 植物缺氮后严重影响地上部分生物量的积累, 因此, 揭示植物如何抵抗或适应低氮胁迫的分子机制具有重要意义。杨树(*Populus tremula* × *P. alba*)*NAC1*(NAM, ATAF, CUC 1)基因位于调控网络上游, 在低氮环境下调控下游关键基因的表达, 进而调控根系生长以抵抗低氮胁迫。本文以光皮桦(*Betula luminifera*)G49-3 无性系组培苗为材料, 探讨了 miR164 及其靶基因 *NAC1* 对低氮胁迫的响应。通过 RACE 技术克隆了光皮桦 *NAC1* 基因(GenBank 登录号: KT900889), 全长 1497 bp, 编码 358 个氨基酸, N 端具有高度保守的 NAM 结构域; 运用 5'-RACE 验证了 *NAC1* 为 miR164 靶基因, 切割位点在第 10 和 11 位碱基之间; 采用 qRT-PCR 分析 miR164 与靶基因 *NAC1* 在低氮胁迫时的表达模式, 发现 miR164 表达在根中的低氮处理前期(4 d)受到抑制, 而后升高, 而茎叶中表达模式与根不同; 靶基因 *NAC1* 与 miR164 表达水平呈负相关, 且在恢复实验组(重新添加全营养液)中, 根中 miR164 表达上升, *NAC1* 显示出相应的表达变化, 暗示 miR164 及其靶基因 *NAC1* 可能在低氮胁迫响应中发挥调控功能。本研究结果有助于揭示 miR164 对 *NAC1* 在低氮胁迫响应中转录后水平的分子调控机制, 为进一步研究 miR164-*NAC1* 在低氮胁迫响应中的功能提供有价值的信息。

**关键词:** 光皮桦; 低氮胁迫; miR164; 靶基因; 表达分析

## Expression analysis of miR164 and its target gene *NAC1* in response to low nitrate availability in *Betula luminifera*

Jun Wu, Junhong Zhang, Menghui Huang, Minhui Zhu, Zaikang Tong

Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

**Abstract:** Nitrogen, an essential macronutrient for the growth and development of plants, affects above-ground biomass accumulation dramatically. Thus, it is very important to reveal the molecular mechanisms of how

收稿日期: 2015-05-26; 修回日期: 2015-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31300566)和浙江省竹木新品种选育重大科技专项(编号: 2012C12908-8)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31300566) and Zhejiang Province Science and Technology Support Program (No. 2012C12908-8)]

作者简介: 吴骏, 在读硕士研究生, 专业方向: 林木分子生物学。E-mail: wujunames@126.com

张俊红, 副教授, 研究方向: 植物逆境生理与分子生物学。E-mail: zjh6719036@163.com

吴骏和张俊红为共同第一作者。

通讯作者: 童再康, 教授, 研究方向: 林木遗传育种。E-mail: zaikangtong@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-231

网络出版时间: 2015/12/30 17:12:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151230.1712.002.html>

plants resist or adapt to low nitrogen availability. The *NAC1*(NAM, ATAF, CUC 1) gene, located in the upstream regulatory network, has been reported to resist low nitrogen by regulating expression of key downstream genes and thus root growth in (*Populus tremula* × *alba*). In this study, we detected the responses of miR164 and its target gene *NAC1* under nitrate-starvation condition using the *Betula luminifera* somaclones G49-3 as material. The *NAC1* gene which contains 1497 bp sequence, encodes 358 amino acids and contains a highly conserved NAM domain at N terminal was cloned by the RACE method. The *NAC1* was then validated to be the target gene of miR164 via 5'-RACE, and the cleavage site was between the 10<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> base. The expression patterns of miR164 and its target gene *NAC1* were further detected under nitrate-starvation condition through qRT-PCR analysis. The results showed that miR164 expression was repressed by nitrate-starvation at the beginning of the treatment (4 d) and then ascended. However, the expression pattern of miR164 in roots was different from that in shoots and leaves. Moreover, the expression levels of target gene *NAC1* and miR164 were negatively correlated. The expression level of miR164 in root was increased while that of *NAC1* was decreased under Re treatment, which indicated that miR164 and its target gene *NAC1* play a regulatory role in response to low nitrate availability. The findings of our study may help elucidate the molecular mechanisms by which miR164 regulates target gene *NAC1* at post-transcriptional level, and provide valuable information for further study of the regulatory roles of miR164-*NAC1* under nitrate-starvation condition.

**Keywords:** *Betula luminifera*; nitrate-starvation; miR164; target gene; expression analysis

氮是植物生长发育所必需的大量营养元素之一,是细胞构成成分的重要组成元素,缺氮后迅速抑制植物生长。为了维持正常生长发育,植物必需从土壤中吸收足够的氮。然而,因水土流失、微生物消耗等原因,土壤氮素往往不能满足植物需求。为提高植物生长量,每年大量氮肥(约 120 Tg N)施用到土壤<sup>[1]</sup>,而 75%以上氮肥未被植物吸收流失到环境中,造成水富营养化和空气中 NO<sub>x</sub> 气体增加<sup>[2]</sup>。因此,揭示植物应对低氮胁迫的分子调控机制对于提高植物生产力和减少氮肥的施用等具有重大意义<sup>[3]</sup>。在长期进化过程中,植物已进化出多种策略应对土壤中的低氮胁迫,包括形态、生理以及生物化学的适应,这些适应涉及一系列基因对土壤低氮胁迫的响应调控<sup>[4]</sup>。已有研究表明,氮胁迫响应相关基因涉及广泛的生物学过程,包括初级和次级代谢、基因转录水平的调节、蛋白质合成、生长素转运及信号传导等<sup>[5,6]</sup>。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*ANR1*(*Arabidopsis* nitrate regulated 1)是第一个与氮调控相关的转录因子,与低氮胁迫下根构型的变化有关<sup>[7]</sup>。拟南芥 *NRT1.1/CHL1*(Nitrate transporter 1.1/Chlorate resistant 1)的发现加深了对氮信号传导的进一步理解,*NRT1.1/CHL1* 是一个氮感受器,可感受土壤中氮浓度的变化<sup>[8]</sup>。通过对转录组及基因组的分析发现了其他一些氮信号感应、吸收和代谢相关的基因,

如 *NLP7*(NIN-like protein 7)<sup>[9]</sup>、*CIPK8*(Calcineurin B-like interacting protein kinase 8)<sup>[10]</sup>、*CCAI*(Circulating cathodic antigen 1)<sup>[11]</sup>等。然而,对于氮素调节的分子调控网络中仍存在许多待解难题,其中 microRNA(miRNA)在这一过程中扮演着重要角色<sup>[12~14]</sup>。

miRNA 是一类内源性、非编码的小 RNA 分子,通过碱基互补配对原则切割靶基因 mRNA、翻译抑制、介导 DNA 甲基化等实现调控功能<sup>[15]</sup>。miRNA 参与调控植物器官的形态建成、激素应答途径、逆境胁迫和营养代谢等一系列过程<sup>[16,17]</sup>。植物 miRNA 对靶基因的转录后调控是实现其功能的主要方式,分析 miRNA 及其靶基因在特定生长阶段或生长环境条件下的表达模式对于理解 miRNA 及其靶基因的功能具有重要意义。已有研究表明 miRNA 在植物非生物胁迫中发挥重要调控功能。例如,蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)miR398 和 miR408 受干旱胁迫诱导表达,靶基因 *CSD1*(Copper superoxide dismutase 1)和 *COX5b* (Cytochrome c oxidase subunit Vb)表达量显著下降<sup>[18]</sup>;拟南芥 miR399 表达受低磷胁迫抑制,靶基因 *UBC* (Ubiquitin-conjugating enzyme)上调表达以适应低磷环境<sup>[19]</sup>;拟南芥 miR393/AFB3 在低氮胁迫时通过生长素通路调节根构型,以适应低氮环境<sup>[20]</sup>;拟南芥 miR169 表达受低氮胁迫抑制,靶基因 *NFYA*(Nuclear transcription factor Y-alpha)表达

上调,与 *AtNRT1.1*、*AtNRT2.1* 等构成调控网络调节氮代谢<sup>[21]</sup>。杨树(*P. tremula* × *alba*) miR164 在低氮胁迫前 12 h 诱导表达,而后下调表达,至 48 h 几乎检测不到,靶基因 *NAC1*(*NAM*, *ATAF*, *CUC 1*)显示出相反表达模式,并通过调控下游关键基因的表达,进而调控根系生长以适应低氮胁迫<sup>[22]</sup>。miR164 靶基因 *NAC1* 是植物中一种重要的转录因子,与低氮、干旱、高盐、低温等多种非生物胁迫应答有关<sup>[22~25]</sup>。

光皮桦(*Betula luminifera*)为桦木科(*Betulaceae*)桦木属(*Betula*)落叶乔木,属我国特有速生珍贵树种,主要分布于秦岭和长江流域以南至两广北部及西部地区,其材质优良、纹理细致、木材坚硬,为高级实木家具和地板等优良原料,是近年我国南方山区大力发展的重要用材树种<sup>[26,27]</sup>。目前,多数人工林营建的立地条件较差,可利用氮不足,成为限制林木速生丰产的重要因素。为此,选择对土壤氮、磷元素反应敏感的光皮桦为材料,研究林木对低氮胁迫的响应方式,了解其耐低氮的分子机理,对于筛选或培育耐低氮的优良速生新品种具有重要意义。miR164 在植物低氮胁迫时发挥重要调控功能。为揭示 miR164 及其靶基因 *NAC1* 在光皮桦低氮胁迫时的分子调控机制,本文克隆了光皮桦 *NAC1* 基因,利用 5'-RACE 验证其为 miR164 靶基因,采用 qRT-PCR 分析 miR164 及其靶基因 *NAC1* 在低氮胁迫时的表达模式,揭示了 miR164 对靶基因 *NAC1* 在低氮胁迫响应中转录后水平的分子调控机制,为进一步研究 miR164-*NAC1* 在低氮胁迫响应中的功能提供有价值的信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选用光皮桦 G49-3 无性系组培苗为实验材料,植株培养在 1/2 MS 固体培养基中,培养温度(25±2)°C,光照时间为 12 h/d,光强 69 075~92 100 μmol/m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验处理

组培 2 个月的光皮桦无性系 G49-3 移入洗净、消毒的沙子,置于温室(光强 69 075~92 100 μmol/m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间为 16/8 h 白天/黑夜,培养温度 25/20°C 白

天/黑夜)中培养 4 周,期间以全营养液(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度为 15 mmol/L)浇灌,营养液配制参照卫海荣等方法<sup>[22]</sup>。选择长势一致的幼苗进行处理,低氮处理用 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度为 0.03 mmol/L 营养液浇灌,与全营养液相比缺少的 K<sup>+</sup>用 KCl 补齐,对照组施以全营养液(15 mmol/L)。每天浇灌一次,每次 5 mL,分别处理 1 d、2 d、4 d、30 d,另有一组低氮处理 4 d 后重新添加全营养液(15 mmol/L)后培养 1 d,记为恢复实验组 Re(Replenish)处理,每组 3 个重复。各处理组于每日上午 11 时分别取根、茎、叶,液氮速冻后于 -70°C 冰箱保存。

#### 1.2.2 miR164 靶基因的克隆

应用光皮桦 small RNA 文库高通量测序获得的 miR164 序列和转录组测序获得的 EST 序列,运用在线平台 psRNATarget(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)进行了靶基因预测,预测到的靶基因序列经 BLAST 比对和保守结构域分析初步鉴定为 *NAC1* 基因。基于该片段序列设计 5'和 3' RACE 引物,分别为:

NAC1-R :5'-GTAGCCCTGTTAGTCCTCAAAC-CAGTT-3';

NAC1-F :5'-CCTGCTTCTCCAATCCCATGTAT-GCTC-3'。

使用 SMART<sup>™</sup> RACE 试剂盒(Clontech, USA)克隆基因全长,所用 T 载体和感受态细胞为 pEASY-T1 Simple Cloning Kit(北京全式金生物技术有限公司),测序由华大基因(上海)完成。

#### 1.2.3 序列分析

应用 FGESH(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>)分析推测基因编码蛋白的氨基酸组成,选择毛果杨(*Populus trichocarpa*)作为参考基因组;采用 ClustalX 进行多序列比对。用 ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)工具推测分子量和等电点(pI)。基于拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、蒺藜苜蓿等 *NAC1* 氨基酸序列,采用 MEGA 4.0 软件(邻近法)进行多序列比较,对光皮桦 *NAC1* 进行系统进化分析。

#### 1.2.4 靶基因的 5'-RACE 验证

利用 5'-RACE 技术进行靶基因验证<sup>[28]</sup>,在

miR164 与 *NAC1* 互补位点下游设计 5'-RACE 引物 (NAC1-SP: 5'-TCCCGTAAGTGGAGCAGTTTGAG-CAGAGTA-3'), 采用 GeneRacer Kit (Invitrogen, 美国), 直接在 RNA 5' 端加上寡核苷酸接头后用 Oligo(dT) 反转录成 cDNA。将 cDNA 稀释 10 倍后用 Hot start EX *Taq* polymerase (宝生物工程(大连)有限公司) 进行 PCR 反应, 将目标序列割胶回收后连接到 pEASY-T1 克隆载体, 转化感受态细胞, 涂板后 37°C 过夜培养, 挑取单克隆摇菌, 选择至少 10 个单克隆测序。

### 1.2.5 miR164 的 qRT-PCR 分析

小 RNA 提取采用通用植物 microRNA 提取试剂盒 (BioTeke, 北京), 用 NCode VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, 美国) 将小 RNA 加 A 反转录成 cDNA, 稀释 10 倍后用于 miRNA 定量分析。正向引物为 q164-F: 5'-GAAGCAGGGCACGTGCA-3', 反向引物为试剂盒中的通用定量引物 (Invitrogen)。在前期筛选与分析后, 选择 U6 为内参基因, 正向引物为 qU6-F: 5'-TCGGGGACATCCGATAAAATTGGAA-3', 反向引物为 qU6-R: 5'-GGAC-CATTTCTCGATTTATGCGTGTCA-3'。反应体系及程序按说明书进行。

### 1.2.6 miRNA 靶基因 *NAC1* 的 qRT-PCR 分析

总 RNA 提取采用 Trizol 法 (Invitrogen), cDNA 合成采用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit (宝生物工程(大连)有限公司), 稀释 5 倍后用于定量分析。应用 Primer Premier 5.0 设计定量引物, 分别为:

qNAC1-F: 5'-CTGGGTCATGCACGAATACAG-ATTG-3';

qNAC1-R: 5'-GGGATTCGAAGAACCTCCATA-AAGA-3'。

应用 SYBR Premix EX *Taq* Kit (宝生物工程(大连)有限公司) 在 BioRad CFX96 上进行定量分析, 具体反应体系和步骤参照说明书。根据前期光皮桦内参基因筛选的结果, 选择 *RPL39* (Large ribosomal subunit 39) 作为内参基因 (GenBank 登录号: KP245805), 扩增该基因的引物序列为:

qRPL39-F: ATGCCGTCGCACAAGACCTT;

qRPL39-R: CCAGGCTCATCCACCTTAGAAC。

### 1.2.7 统计学分析

应用 R3.1.3 软件进行统计学分析, 包括表达量变化间的 *t* 检验, 以及采用双变量相关模式进行 miR164 与靶基因的相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 光皮桦 *NAC1* 基因克隆及分析

光皮桦 *NAC1* 基因全长 1497 bp, 包含 195 bp 5' UTR、151 bp 3' UTR 以及 1077 bp ORF, 编码 358 个氨基酸。*NAC1* 蛋白分子量为 40.4 kDa, 等电点为 7.67。序列相似性分析表明, 光皮桦 *NAC1* 与拟南芥 *NAC1* 序列相似性最高, C 端变异较大, N 端具有 NAM 保守结构域, 可分为 A、B、C、D、E 5 个亚结构域 (图 1)。系统进化分析表明, 光皮桦 *NAC1* 与拟南芥 *NAC1*、*CUC2*、杨树 *NAC1* 及茶 (*Camellia sinensis*) *NAC1* 等同属于一个分支, 属于 *CUC2* 亚族。5'-RACE 结果表明 *NAC1* 可被 miR164 切割, 切割位点位于互补区的第 10 和第 11 位碱基之间, 验证该基因是 miR164 的靶基因。

### 2.2 miR164 在低氮胁迫下的表达分析

本文利用 qRT-PCR 技术实时监测了 miR164 在光皮桦低氮胁迫响应中的动态表达。miR164 家族除 miR164a 外, miR164b 和 miR164c 表达量均较低, qRT-PCR 检测不到, 说明 miR164a 可能在低氮胁迫响应中发挥主要调控作用。表达分析表明, miR164a 在根、茎、叶中的表达模式略有不同, 具体表现为: 在根中呈“降-升”表达模式, 即低氮处理后 4 d 内, miR164a 表达持续下降, 4 d 时降到极低水平, 与对照组相差接近 10 倍, 而将低氮处理 4 d 的植株放回全营养液中时, miR164a 表达水平呈升高趋势。低氮处理 30 d, miR164a 表达量升高, 对照组的表达水平下降。在茎中呈现“升-降”表达模式, 即在低氮处理后 4 d 内, miR164a 表达水平持续升高, 至 30 d 时降至最低。在叶中 miR164a 表现出持续降低的表达模式, 处理 30 d 降低至极低水平。同样对于低氮处理 4 d 的幼苗, 重新添加全营养液时, miR164a 表达量上升 (图 2)。

### 2.3 miR164 靶基因 *NAC1* 在低氮胁迫中的表达分析

对光皮桦 *NAC1* 在低氮胁迫时的定量分析表明,





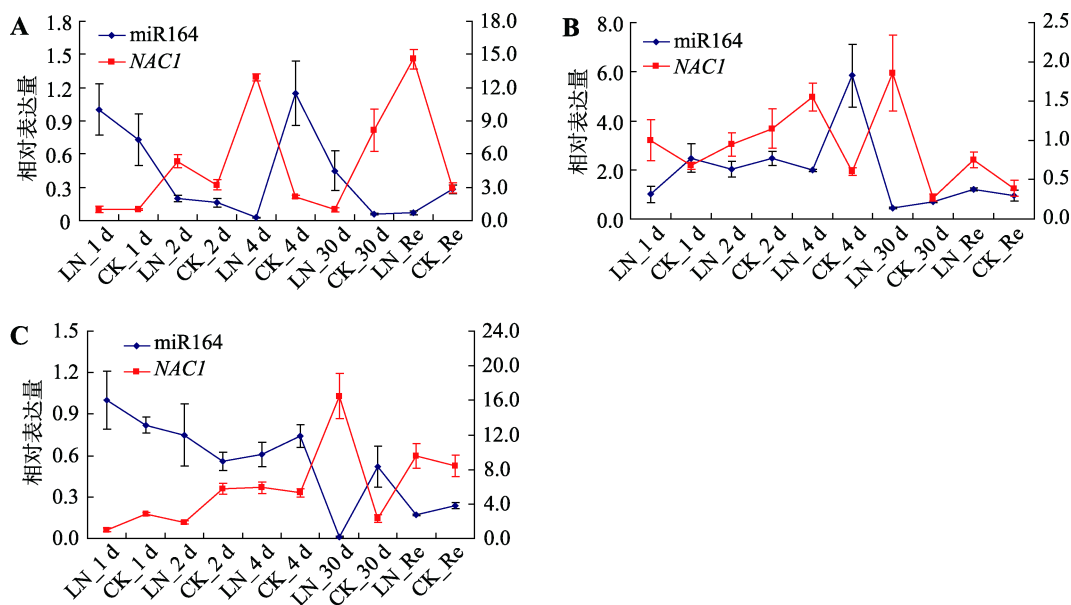


图 2 miR164 及其靶基因 *NAC1* 表达模式分析

Fig. 2 Expression patterns of miR164 and its target gene *NAC1*

A: 根 miR164 与靶基因 *NAC1* 表达模式; B: 茎 miR164 与靶基因 *NAC1* 表达模式; C: 叶 miR164 与靶基因 *NAC1* 表达模式。LN: 低氮水平; CK: 正常氮水平。

### 3 讨论

由于植物特有的固着生活方式, 已进化出多种方式应对环境中氮素含量的变化。例如, 针对氮素变化调节对氮元素的运输能力<sup>[29]</sup>, 或在体内储存足够的氮以便于重复利用<sup>[30]</sup>, 或根据土壤中氮含量的变化改变根的构型<sup>[31]</sup>。卫海荣等<sup>[22]</sup>报道了杨树 *NAC1* 基因在低氮胁迫响应过程中促进根系发育, 且处于核心地位。

*NAC1* 基因是 *NAC* 基因家族的一个转录因子, 具有调控逆境胁迫应答的作用。早期研究发现, 该基因在干旱、高盐、低温等多种非生物逆境胁迫中发挥调控作用<sup>[23-25]</sup>。本文首次在光皮桦中克隆了 *NAC1* 基因, 保守结构域分析表明 *NAC1* 基因在 N 端具有保守 NAM 结构域, C 端高度变异, 个别氨基酸位点保守, 具有 *NAC1* 基因的典型特征<sup>[32]</sup>。拟南芥 *NAC1* 在生长素信号途径下游侧根伸长起核心调控作用<sup>[33-35]</sup>, 且这个基因受 miR164 的转录后调控<sup>[35]</sup>。Motte 等<sup>[36]</sup>指出拟南芥 *CUC2* 在根系生长的早期阶段发挥重要作用。*NAC1* 基因可以激活生长素信号途径中 *AIR3* (Auxin Induced in Root Culture3) 基因, 通过调控生长素信号来促进侧根的形成和发育<sup>[22]</sup>。然

而, 蒺藜苜蓿 *NAC1* 受 miR164 调控, 但不受生长素诱导, 对侧根形成无影响<sup>[37]</sup>, 表明不同物种的 *NAC1* 基因可能有着不同的调控和生物学功能。

鲁广宁等<sup>[38]</sup>研究发现番茄 (*Solanum lycopersicum*) *NAC1* 基因在低温胁迫下表达量短期内迅速升高, 且在根部表达量最高; Li 等<sup>[23]</sup>研究表明辽宁碱蓬 (*Suaeda liaotungensis*) *NAC1* 基因在干旱、高盐、低温及生长素处理下, 其表达量在 24 h 内均呈“先升后降”表达模式。杨树 *NAC1* 在根中高度表达, 不受生长素诱导, 表达量在低氮胁迫 24 h 内持续下降, 而后升高<sup>[22]</sup>。本研究中, 光皮桦 *NAC1* 基因在低氮处理下, 根中呈“先升后降”表达模式, 而茎和叶中表达量持续上升, 表明 *NAC1* 基因在低氮胁迫下在不同组织中存在不同表达模式。低氮胁迫条件下, 根中 *NAC1* 表达量快速上升, 以促进根系发育, 从而增强光皮桦幼苗对氮素的吸收。至 30 d 时, 根中 *NAC1* 基因表达显著降低, 可能是因植株中已没有足够的养分供应根系的快速生长, 是一种反馈调节模式。而此时正常组中 *NAC1* 显著上调, 表明正常情况下根系在此时进入快速生长期。*NAC1* 基因是 miR164 的靶基因, 根和叶中 miR164a 表达与 *NAC1* 呈显著负相关, 在茎中也表现出相反趋势。研究结

果说明在低氮胁迫下, miR164 对 *NAC1* 的表达变化起重要调控作用。有关 miR164 如何受低氮调控, 以及 *NAC1* 通过何种途径参与生长素代谢, 进而调控根系的发育, 有待于更深入的研究。

## 参考文献(References):

- [1] Gutiérrez RA. Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition. *Science*, 2012, 336(6089): 1673–1675. [DOI]
- [2] Robertson GP, Vitousek PM. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annu Rev Environ Res*, 2009, 34: 97–125. [DOI]
- [3] Xu GH, Fan XR, Miller AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 153–182. [DOI]
- [4] Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot*, 2002, 53(370): 959–970. [DOI]
- [5] Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol*, 2004, 136(1): 2483–2499. [DOI]
- [6] Wang RC, Okamoto M, Xing XJ, Crawford NM. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 556–567. [DOI]
- [7] Zhang HM, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 1998, 279(5349): 407–409. [DOI]
- [8] Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 2009, 138(6): 1184–1194. [DOI]
- [9] Castaings L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Taconnat L, Renou JP, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Meyer C, Krapp A. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 57(3): 426–435. [DOI]
- [10] Hu HC, Wang YY, Tsay YF. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J*, 2009, 57(2): 264–278. [DOI]
- [11] Gutiérrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR, Coruzzi GM. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4939–4944. [DOI]
- [12] Iang G, He H, Yu DQ. Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48951. [DOI]
- [13] Trevisan S, Nonis A, Begheldo M, Manoli A, Palme K, Caporale G, Ruperti B, Quaggiotti S. Expression and tissue-specific localization of nitrate-responsive miRNAs in roots of maize seedlings. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(6): 1137–1155. [DOI]
- [14] Zhao M, Tai HH, Sun SZ, Zhang FS, Xu YB, Li WX. Cloning and characterization of maize miRNAs involved in responses to nitrogen deficiency. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29669. [DOI]
- [15] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 669–687. [DOI]
- [16] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338. [DOI]
- [17] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 787–799. [DOI]
- [18] Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Feveireiro MP, dos Santos DM. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 2010, 231(3): 705–716. [DOI]
- [19] Fujii H, Chiou T-J, Lin S-I, Aung K, Zhu JK. A miRNA involved in Phosphate-Starvation Response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15(22): 2038–2043. [DOI]
- [20] Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutiérrez RA. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4477–4482. [DOI]
- [21] Zhao M, Ding H, Zhu JK, Zhang FS, Li WX. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2011, 190(4): 906–915. [DOI]
- [22] Wei HR, Yordanov YS, Georgieva T, Li X, Busov V. Nitrogen deprivation promotes *Populus* root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks. *New Phytol*, 2013, 200(2): 483–497. [DOI]



- [23] Li XL, Yang X, Hu YX, Yu XD, Li QL. A novel NAC transcription factor from *Suaeda liaotungensis* K. enhanced transgenic *Arabidopsis* drought, salt, and cold stress tolerance. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(5): 767–778. [DOI]
- [24] Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM. Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the *MIR164* family in developmental robustness. *Development*, 2007, 134(6): 1051–1060. [DOI]
- [25] Zeng HQ, Zhu YY, Bao Y, Shen QR, Guo K, Huang SQ, Yang ZM. Relationship between the development of tomato lateral roots and expression of miR164, *NAC1* under P deficiency. *Plant Nutr Fert Sci*, 2010, 16(1): 166–171.  
曾后清, 朱毅勇, 包勇, 沈其荣, 郭凯, 黄思齐, 杨志敏. 缺磷胁迫下番茄侧根形成与 miR164 及 NAC1 表达的关系. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(1): 166–171. [DOI]
- [26] Hu XY, Li ZZ, Liang YC. The progress of the studies on the excellent fast-growing tree *Betula luminifera*. *J Fujian Forestry Sci Technol*, 2006, 33(2): 159–163.  
胡晓媛, 李志真, 梁一池. 优良速生树种光皮桦研究进展. 福建林业科技, 2006, 33(2): 159–163. [DOI]
- [27] Zhang JH, Huang HH, Tong ZK, Cheng LJ, Liang YL, Chen YL. Genetic diversity in six natural populations of *Betula luminifera* from southern China. *Biodiv Sci*, 2010, 18(3): 233–240.  
张俊红, 黄华宏, 童再康, 程龙军, 梁跃龙, 陈奕良. 光皮桦 6 个南方天然群体的遗传多样性. 生物多样性, 2010, 18(3): 233–240. [DOI]
- [28] Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1605–1619. [DOI]
- [29] Gojon A, Nacry P, Davidian JC. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(3): 328–338. [DOI]
- [30] Martinoia E, Heck U, Wiemken A. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, 1981, 289(5795): 292–294. [DOI]
- [31] Shin R, Berg RH, Schachtman DP. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(8): 1350–1357. [DOI]
- [32] Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 79–87. [DOI]
- [33] Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 2000, 14(23): 3024–3036. [DOI]
- [34] Xie Q, Guo HS, Dallman G, Fang SY, Weissman AM, Chua NH. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*, 2002, 419(6903): 167–170. [DOI]
- [35] Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1376–1386. [DOI]
- [36] Motte H, Verstraeten I, Werbrouck S, Geelen D. CUC2 as an early marker for regeneration competence in *Arabidopsis* root explants. *J Plant Physiol*, 2011, 168(13): 1598–1601. [DOI]
- [37] D'Haeseleer K, den Herder G, Laffont C, Plet J, Mortier V, Lelandais-Brière C, de Bodt S, de Keyser A, Crespi M, Holsters M, Frugier F, Goormachtig S. Transcriptional and post-transcriptional regulation of a NAC1 transcription factor in *Medicago truncatula* roots. *New Phytol*, 2011, 191(3): 647–661. [DOI]
- [38] Lu GM, Yang R, Jiang R, Wang SH, Zhao FK. Analysis on expression patterns of *NAC1* gene in tomato induced by low temperature. *Agr Sci Technol*, 2015, 16(1): 9–11.  
鲁广宁, 杨瑞, 姜荣, 王绍辉, 赵福宽. 低温诱导的番茄 NAC1 基因表达特征分析. 农业科学与技术(英文版), 2015, 16(1): 9–11. [DOI]

(责任编辑: 李传友)