

胁迫条件下毛竹 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 表达研究

王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 董丽莉, 娄永峰, 高志民*

(国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 在植物生长发育以及抗逆等过程中起着重要的调控作用。*miR164* 作为植物特有的 miRNA, 其主要的靶基因是植物 NAC 转录因子。为揭示毛竹 *miR164* 对其靶基因的调控机制, 通过茎环引物法和 RT-PCR 技术, 从毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 中克隆出 *miR164b* 成熟序列及其靶基因 *PeNAC1*。序列分析表明 *miR164b* 的靶点位于 *PeNAC1* 编码区, RLM-5' RACE PCR 产物测序结果证实切割位点位于靶点的第 10 - 11 位碱基之间。组织特异性表达分析表明, 毛竹 *miR164b* 和 *PeNAC1* 在根、茎、叶及鞘中均表达, 其中 *miR164b* 在根中表达丰度最高, 在茎中表达丰度最低; 而 *PeNAC1* 的表达丰度恰好与 *miR164b* 相反。实时定量 PCR 结果显示, NaCl (250 mmol · L⁻¹)、低温 (4℃) 和强光 (1 500 μmol · m⁻² · s⁻¹) 处理后毛竹叶片中 *miR164b* 的表达均明显下调, GA₃ (100 μmol · L⁻¹) 处理后 *miR164b* 表达量明显上调; 而在同样处理条件下, *PeNAC1* 的表达恰好呈现出与其完全相反的趋势。由此表明, *miR164b* 对靶基因 *PeNAC1* 具有表达调控作用, 可能与毛竹响应非生物胁迫的抗逆过程密切相关, 这为利用 miRNA 开展竹子抗逆分子育种提供了参考。

关键词: 毛竹; miRNA; NAC 转录因子; 非生物胁迫

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

Expression Analysis of *miR164b* and Its Target Gene *PeNAC1* in *Phyllostachys edulis* under Stress

WANG Li-li, ZHAO Han-sheng, SUN Hua-yu, DONG Li-li, LOU Yong-feng, GAO Zhi-min

(International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) play important roles in a variety of biological growth processes and stress-resistance responses. As the plant-specific miRNA family, the *miR164* mainly targets for NAC transcriptional factors. To reveal the regulatory mechanism for *miR164* and its target gene, the mature sequence of *miR164b* and its targeted sequence of *PeNAC1* were isolated respectively from *Phyllostachys edulis* seedlings by RT-PCR with stem-loop RT primers. The analysis indicated that there was one *miR164b* complementary site located in the open reading frame region of *PeNAC1* mRNA. The sequencing result of RLM-5' RACE confirmed that *PeNAC1* was regulated by *miR164b* through specific cleavage at the site between the 10th and 11th bases. Tissue specific expression of *miR164b* and *PeNAC1* demonstrated that they both expressed in root, stem, leaf and sheath, of which *miR164b* expressed in root with the highest level and the lowest level in stem, while that of *PeNAC1* coincided with *miR164b*

收稿日期: 2014-07-31

基金项目: 国家科技支撑计划专题“分子辅助育种技术集成与示范”(2012BAD23B0504)、国际竹藤中心基本科研业务费专项资金项目“毛竹快速生长期特异转录调控网络的构建及其应用”(1632015008)、国家林业局 948 项目“小分子 RNA 分离技术引进”(2011-4-55)。

作者简介: 王丽丽 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事竹藤花卉分子育种研究。E-mail: wangllawj@163.com

* 通讯作者: (1971—), 男, 河北唐山人, 研究员, 博士生导师。E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

conversely. Real-time quantitative PCR analysis showed that *miR164b* was down-regulated under the treatments of NaCl ($250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), low temperature (4°C) and high light ($1\ 500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), but it was up-regulated obviously under the treatment of GA_3 ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Meanwhile, the expression of *PeNAC1* showed exactly the opposite trends. It is suggested that *miR164b* played a regulator role in the expression of *PeNAC1*, which might be closely related to the resilience process of respond to abiotic stress. This result provides a reference of bamboo molecular breeding for resilience by using miRNA.

Key words: *Phyllostachys edulis*; miRNA; NAC transcriptional factor; abiotic stress

MicroRNAs (miRNAs) 是一类非编码小分子 RNA, 主要通过介导靶基因降解和抑制翻译在植物生长发育和抗逆过程中起重要调控作用^[1]。近年来越来越多的实验证明, miRNAs 在植物响应逆境胁迫过程中起着重要的作用^[2], 如在受干旱、高盐、低温和重金属胁迫时, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.)、水稻 (*Oryza sativa* Linn.)、苜蓿 (*Medicago truncatula* Linn.) 等物种中 *miR393* 的表达会受到不同程度的诱导或者抑制^[3-5], 在拟南芥中过表达水稻 *miR393* 会提高转基因植株的耐盐性^[6]; 在拟南芥中过表达 *miR169* 时可降低植株的抗旱性, 而相反的, 在番茄中过表达 *miR169* 会提高植株的抗旱性^[7]。对于竹类植物 miRNAs 的研究刚刚起步, 从麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus* Lunro)、毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 中分别获得了一批新 miRNAs^[8-10], 并证明光胁迫对麻竹 30 个新 miRNAs 的表达具有不同程度的影响^[8]。

miR164 作为植物特有的 miRNA 家族, 在毛竹中分为 *miR164a* 和 *miR164b* 两个亚家族, 其中 *miR164a* 的预测靶基因为 *PsbP* 基因, *PsbP* 是叶绿体光系统 II 中放氧复合体的外周蛋白, 是保证 PS II 功能正常性的重要组成部分; 而 *miR164b* 主要的靶标基因是植物 NAC 转录因子。NAC 转录因子在 N 端约有 150 个氨基酸组成高度保守的结构域 (分为 5 个亚结构域 A、B、C、D、E), 其 C 端具有丰富的序列多样性, 富含苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸等^[11]。NAC 转录因子参与调控广泛的生物学过程, 如细胞分裂、细胞次生壁合成、器官边界、开花和衰老等植物生长发育过程, 以及参与调控植物对高盐、干旱、低温等非生物逆境胁迫响应过程^[12]。对 *miR164* 及其靶基因 NAC 进行研究对于揭示二者之间的调控方式及其在抗逆过程中作用具有重要意义。本文以毛竹为研究对象, 分离了 *miR164b* 成熟序列及其靶基因 *PeNAC1* 序列, 在分析基因结

构特点的基础上, 通过 RLM-RACE 技术验证了 *miR164b* 的切割位点, 采用 RT-PCR 技术研究了 *miR164b* 和 *PeNAC1* 的组织表达特异性以及光、温度、盐、激素等不同非生物胁迫对二者表达的影响, 以期从非编码基因方面为今后竹子抗逆分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 半年生盆栽实生苗, 栽培基质为腐殖质土和蛭石 (7:3), 培养室培养温度为 25°C , 光照 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期为光/暗 = 16 h/8 h。

1.2 毛竹基因组 DNA 提取、总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用改良的 CTAB 法^[13] 提取毛竹叶片基因组 DNA。分别取毛竹根、幼茎、顶端第三片功能叶及叶鞘以及不同处理后的毛竹叶片 (顶端第三片叶), 迅速放入液氮中研磨成粉末状, 采用 Trizol 法^[14] 提取总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书 (Promega 公司) 合成 cDNA。

1.3 毛竹 *miR164b* 及其靶基因的克隆与分析

根据毛竹 *miR164b* 的成熟序列 (<http://www.bamboogdb.org/>) 设计反转录茎环引物^[15]、正向引物 (Forward Primer) 和反向通用引物 (Universal Reverse Primer), 其中茎环部分通用序列为: 5'-CTCAAC TG-GTGTCTGGACTCGGCAATTCAGTTGAG-3', 根据毛竹 *PeNAC1* 基因 (FP095491) 编码区序列设计引物 (表 1), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。以毛竹叶片 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: $5 \times$ Primer STAR Buffer (Mg^{2+} plus) $4 \mu\text{L}$, dNTP (2.5 mmol) $2 \mu\text{L}$, 正向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, 反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, DMSO $1 \mu\text{L}$, cDNA $0.5 \mu\text{L}$, 高保真酶 (PrimerSTAR) $0.1 \mu\text{L}$ ($52.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 加水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件:

94℃ 30 sec, 62℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 共 35 个循环。

表1 PCR 扩增所用引物序列

名称	引物	序列(5'→3')
<i>miR164b</i>	RT-Primer	CTCAACTGGTGTCTGAGTCGGCAA TTCAGTTGAGAGCACGTG
	Forward Primer	AGCAGCATTGGAGAAGCAGGG
Universal Reversal Primer		CTCAACTGGTGTCTGAGTCTC
<i>PeNAC1</i>	PeNAC1-F	ATGGTGGAGGCGAGGCTGC
	PeNAC1-R	TCAATCGAGTGAGTTCACATCTGTGA
RLM-RACE	164R1	CACACACCCAAGTCTTCTTTAAGAGTTC
	164R2	GCCTTCAAACCTGGTGAACCTGGCTCAGC
q-PCR	qF	CCTCCCCTCATTGACAACCTTCATT
	qR	CCTGAGCAAATACTCTGAGGCC

回收 PCR 产物,进行加 A 反应,反应体系 10 μL : 10 \times PCR Buffer 1 μL , dATP (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , PCR 产物 7.9 μL , LA Taq 酶 0.1 μL ; 反应程序: 72℃ 30 min。反应结束后连接到 pGEM-T easy 载体上,转化大肠杆菌 (*Esherichia coli*) DH5 α 感受态细胞,阳性克隆经酶切检测分析后,送上海生物工程技术服务有限公司测序。

利用在线平台 WebLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 对毛竹 *miR164b* 的成熟序列碱基保守性进行分析,利用 NCBI 公共数据库进行 blast 分析,采用 DNAMAN 软件对 NAC1 同源蛋白序列结构域进行分析。用在线软件 <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/> 预测毛竹 *miR164b* 靶位点。利用在线平台 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/Webtools/plantcare> 分析 *miR164b* 前体及其靶基因上游启动子区域所含作用元件。

1.4 *miR164b* 介导靶基因的切割位点分析

根据靶基因预测切割位点,在位点下游设计特异性 RLM-5' RACE 引物(表 1)。按照 TaKaRa 的 RLM-RACE 试剂盒(Full RACE Kit with TAP, Code No. 6107)操作说明,去掉将 RNA 去磷酸化和去帽子的结构,分别对总 RNA 进行纯化处理、RACE Adaptor 的连接、反转录,获得 cDNA。

首先进行 Outer PCR 反应,反应体系(20 μL)包括 10 \times GC Buffer II 2 μL 、1 \times cDNA Dilution Buffer II 8 μL 、cDNA 模板 2 μL 、特异性 Outer 引物 164R1 (10 μM) 1 μL 、5' RACE Outer Primer (10 μM) (试剂盒提供) 1 μL 、LA Taq (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL 、dH₂O 5.75 μL 、PCR 反应程序: 94℃ 3min; 94℃ 30 sec; 55℃ 30 sec; 72℃ 30 sec, 共 30 个循环。以第一轮 PCR 产物为模板,进行第二轮 Inner PCR 反应,体系(20 μL)包括 5 \times PrimerSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 4 μL 、dNTP

(2.5 mM each) 1.6 μL 、Outer PCR 反应液 1 μL 、特异性 Inner 引物 164R2 (10 μM) 1 μL 、5' RACE Inter Primer (10 μM) (试剂盒提供) 1 μL 、PrimerSTAR HS DNA Polymerase (2.5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL 、dH₂O 11.2 μL 、反应程序: 98℃ 3 min; 98℃ 30 sec; 55℃ 30 sec; 72℃ 30 sec, 共 30 个循环。

1.5 胁迫处理

取长势一致的毛竹,分别进行处理。干旱与 NaCl 处理:选毛竹顶端第三片叶片,分别放入开口的空培养瓶中干旱处理 2 h、浸入 NaCl 溶液 (250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中处理 2 h,以浸入蒸馏水中 2 h 处理的叶片为对照;将毛竹顶端第三片叶片浸入 GA₃ 溶液 (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中处理 2 h,以浸入甲醇中处理 2 h 的叶片为对照^[16-17]。光照处理:将毛竹分别置于黑暗条件下处理 24 h、强光 (1 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 处理 2 h 之后,取第三片叶片,同时以正常光照 (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 条件下的为对照。温度处理:将毛竹分别置于 42℃ 处理 2 h、4℃ 处理 2 h 之后,取第三片叶片,同时以室温 (25℃) 的叶片为对照。分别提取样品 RNA,合成 cDNA 备用。

1.6 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 的表达分析

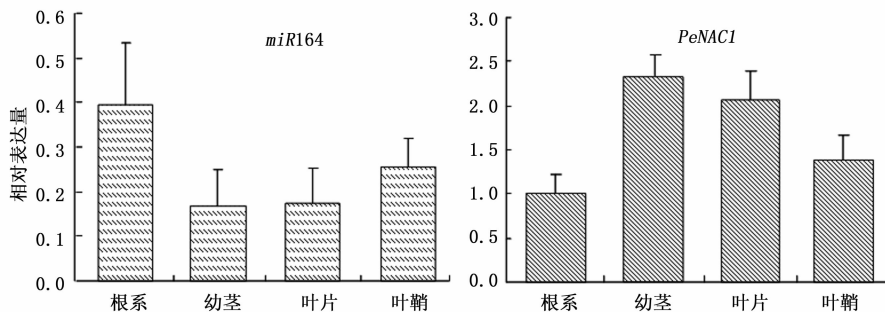
利用毛竹 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 特异性正向引物及通用反向引物,采用 Real-time PCR 方法检测 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 在不同组织中以及在不同处理条件下的表达情况,其中分别选用 U6^[18] 和 NTB^[19] 作为 *miR164b* 及 *PeNAC1* 的定量表达内参。

实时定量 PCR 反应体系 (10 μL), 包括 Maxima[®] SYBR Green Mix (2 \times) 5 μL 、正、反向引物 (10 μM) 各 0.4 μL 、cDNA 1 μL 和 ddH₂O 3.2 μL 。反应程序: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 58℃ 60 s, 45 个循环。反应在 analytikjena 公司的 q-Tower 仪上进行,重复 3 次,反应结束后采用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 算法进行分析^[20]。

2 结果与分析

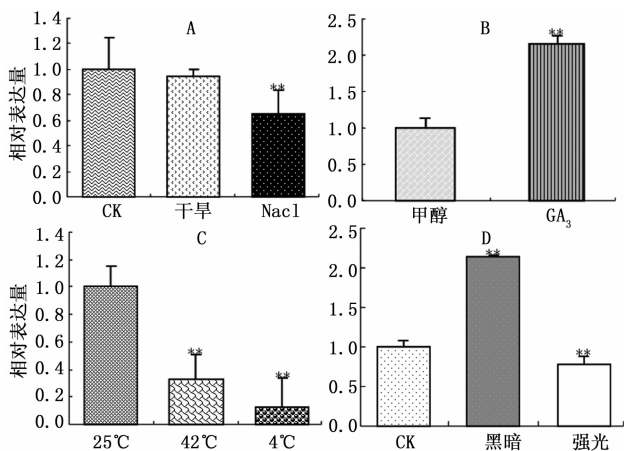
2.1 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 序列的获得

利用 *miR164b* 特异性正向和反向通用引物进行 PCR 扩增,之后 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,发现在约 70 bp 处有明显单一的亮带,与 *miR164b* 预测的茎环引物法反转录扩增序列大小一致,测序结果表明,以茎环法反转录扩增后得到的序列大小为 65 bp,且其中包括毛竹 *miR164b* 的成熟序列 (21 bp)。目前在 miRBase 21 中 *miR164* 家族共

图3 毛竹 *miR164b*、*PeNAC1* 在不同组织中的表达分析

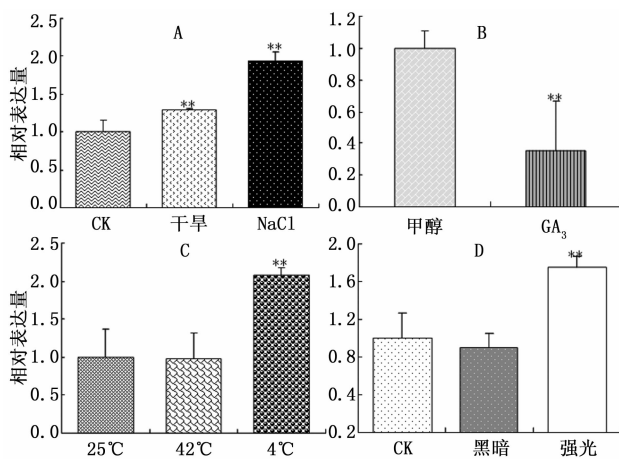
(图5A)。干旱处理后毛竹中 *miR164b* 和 *PeNAC1* 的表达趋势与 NaCl 处理后的类似,但呈现的程度并不一致,干旱处理后 *miR164b* 下调不显著,而 *PeNAC1* 的上调却达到极显著水平,这意味着可能还有其它内在干旱调控响应机制参与 *PeNAC1* 的表达调控。

GA_3 处理后,毛竹 *miR164b* 的表达明显上调,约为对照的 1.1 倍,表达差异达极显著水平($p < 0.01$) (图4B);*PeNAC1* 的表达呈现明显的下调(约为对照的 30%),表达差异达极显著水平($p < 0.01$) (图5B)。研究表明,miRNA 可参与多个植物激素信号通路,如 *miR159* 可以通过介导其靶基因(主要为 MYB 转录因子家族基因)响应 GA ^[23]、 ABA ^[24] 以及乙烯处理^[25],从而影响植物的花发育以及种子萌发。目前尚无 *miR164* 和 *NAC1* 响应 GA_3 的报道,因此推断 GA_3 处理对 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 表达的影响是间接的,可能是通过其调控序列中的赤霉素作用元件(表2)来实现的。

A: 干旱和 NaCl 处理; B: GA_3 处理; C: 温度处理; D: 光照处理。图4 不同非生物胁迫处理毛竹 *miR164b* 表达分析

经高温(42°C)和低温(4°C)处理后,毛竹中 *miR164b* 的表达均呈现不同程度的下调,差异均达到极显著水平($p < 0.01$) (图4C);低温处理后毛竹叶片中 *PeNAC1* 的表达明显上调,差异达到显著水

平($p < 0.05$) (约为对照的 2 倍),这与甜橙 CsNAC 当受到低温胁迫时表达会上调相一致^[26],而高温处理后表达差异不显著(图5C)。

A: 干旱和 NaCl 处理; B: GA_3 处理; C: 温度处理; D: 光照处理。图5 不同非生物胁迫处理毛竹 *PeNAC1* 表达分析

经过黑暗处理后毛竹 *miR164b* 的表达量呈现上调,而强光($1\ 500\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)处理后则呈现一定程度的下调,差异均达到极显著水平($p < 0.01$) (图4D);黑暗处理后 *PeNAC1* 相对表达量呈现一定程度下调,表达差异未达显著水平,而强光($1\ 500\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)处理后相对表达量呈现上调,表达差异达到极显著水平($p < 0.01$) (约为对照的 1.7 倍) (图5D)。

毛竹 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 在不同胁迫条件下的表达变化,表明它们与毛竹适应逆境的自身调节紧密相关,这与它们自身调控序列中包含多个胁迫应答元件(表2)相符合。

3 结论与讨论

本研究分离获得了毛竹 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1*,并证明切割位点位于靶基因序列的第 10 - 11 位碱基之间;组织特异性检测显示 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 在毛竹根、茎、叶、鞘中均有表达;在

非生物胁迫(NaCl、低温、强光和 GA₃)条件下二者的表达量变化呈完全相反的趋势,表明毛竹 *miR164b* 可在转录水平对 *PeNAC1* 进行调控。

竹子是重要的森林植物资源,在应对森林资源匮乏、全球环境恶化等方面发挥着重要作用,目前随着全球环境的日益变化,高温、干旱、低温、强光等非生物胁迫已经成为影响限制其正常生长的重要因素,因此开展竹类植物抗逆研究亟待进行。研究表明,许多 miRNA 的表达都具有组织特异性^[28-29],如 *miR164* 在小麦根部表达较高,但在其它组织中却检测不到表达量^[30];而本研究 *miR164b* 为组成型表达,这与水稻中 *miR164* 在各组织中均有表达相一致^[31]。miRNA 作为一种非编码基因通过在转录水平切割靶基因来影响其表达,从而对植物的生长发育以及抗逆等过程进行调控^[27]。本研究通过 RLM-5'RACE 技术和不同胁迫条件下毛竹 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 的表达水平变化,证明了 *miR164b* 对其靶基因 *PeNAC1* 的调控作用,这对利用 miRNA 的调控功能进行分子育种具有重要参考价值。

miRNA 及其靶基因之间的调控是一个极为复杂的网络,二者之间可能存在一对多或者多对一的调控作用关系,既体现出其参与生物学过程的广泛性,同时又体现出二者相互作用的精确性。在拟南芥中过量表达 *miR164a* 和 *miR164b* 可导致植株子叶和花器官出现融合、真叶发育不正常等现象,在拟南芥 *miR164a-4* 突变植株中,由于 *CUC2* 的表达量上升导致出现缺刻叶片表型^[32]。*ORE1/NAC2* 基因有促进植物叶片衰老功能,其表达受到 *miR164* 的调控,同时 *miR164* 本身的表达又受 *EIN2* 基因表达的抑制,因此 *EIN2-miR164-ORE1/NAC2* 之间的相互作用关系形成了参与调控植物叶片衰老过程的重要调节网络^[33]。另外 *miR164* 可通过降解 *NAC1*,从而导致植物侧根数目减少,同时二者又均受到生长素的诱导,说明 *miR164* 和其靶基因也可能参与到植物激素信号转到途径调控中^[34-35],这在本实验中 *miR164b* 及其靶基因 *PeNAC1* 的表达受 GA₃ 处理的影响佐证了这一点。然而,关于竹子 *miR164* 家族的功能仍需不断深入研究,包括在同一竹种中 *miR164* 家族各成员是如何协调发挥作用的;各种生物和非生物胁迫是通过何种途径来诱导或者抑制 *miR164* 的表达;除 NAC 转录因子家族外,*miR164* 是否还存在其它有重要功能的靶标基因等等,这些都将是今后竹类植物抗

逆分子育种中的重要研究对象。

参考文献:

- [1] Llave C, Xie Z, Kasschau K DM, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J]. Science, 2002, 297(5589): 2053 - 2056.
- [2] Sunkar R. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses [J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2010, 21: 805 - 811.
- [3] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 2001 - 2019.
- [4] Zhao B T, Liang R Q, Ge L F, et al. Identification of drought-induced microRNAs in rice [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2007, 354(2): 585 - 590.
- [5] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus* [J]. Plant Journal, 2008, 55(1): 131 - 151.
- [6] Gao P, Bai X, Yang L, Lv D, et al. *Osa-MIR393*: A salinity- and alkaline stress-related microRNA gene [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 237 - 242.
- [7] Zhang X, Zou Z, Gong P, et al. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(2): 403 - 409.
- [8] Zhao H S, Chen D L, Peng Z H, et al. Identification and characterization of microRNAs in the leaf of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) by deep sequencing [J]. PLoS One, 2013, (10): e78755.
- [9] Zhao H, Wang L, Dong L, et al. Discovery and comparative profiling of microRNAs in representative monopodial bamboo (*Phyllostachys edulis*) and sympodial bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102375.
- [10] Xu P, Mohorianu I, Yang L, et al. Small RNA profile in moso bamboo root and leaf obtained by high definition adapters [J]. PLoS ONE, 2014, 9(7): e103590.
- [11] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Science, 2005, 10(2): 79 - 87.
- [12] 孙利军, 李大勇, 张慧娟. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用 [J]. 遗传, 2012, 34(8): 993 - 1002.
- [13] 高志民, 范少辉, 高 健, 等. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 725 - 728.
- [14] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. Chinese Forest Science Technology, 2006, 5(3): 52 - 54.
- [15] Chen C, Ridzon D A, Gurgler K J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(20): e179.
- [16] 王京京, 童再康, 黄程前, 等. 巨桉 *EgrCBF1* 和 *EgrCBF2* 基因的克隆和胁迫响应表达分析 [J]. 林业科学, 2012, 48(10): 42 - 48.
- [17] Kayal E W, Navarro M, Marque G, et al. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response

- to cold[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(10): 2455–2496.
- [18] Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(10): 3563–3573.
- [19] Fan C, Ma J, Guo Q, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.
- [20] 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.
- [21] 李伟, 韩蕾, 钱永强, 等. 植物 NAC 转录因子的种类、特征及功能 [J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4): 596–606.
- [22] Li J, Guo G, Guo W, *et al.* MiRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 21(12): 220.
- [23] Achard P, Herr A, Baulcombe DC, *et al.* Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA [J]. *Development*, 2004, 131(14): 3357–3365.
- [24] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination [J]. *Plant Journal*, 2007, 49(4): 592–606.
- [25] Liu Q, Zhang Y C, Wang C Y, *et al.* Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(4): 723–728.
- [26] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, *et al.* A dehydration induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA dependent stress signaling pathway [J]. *Plant Journal*, 2004, 39(6): 863–876.
- [27] Khraiwesh B, Zhu J K, Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819(2): 137–148.
- [28] Meng Y, Shao C, Ma X, *et al.* Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in Arabidopsis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50870.
- [29] Han R, Jian C, Lv J, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the flag leaf and developing seed of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 289.
- [30] Yao Y Y, Guo G G, Ni J F, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(6): R96.
- [31] 谢卡斌. 水稻全长 cDNA 文库的构建和两个 microRNA 的功能研究 [J]. 华中农业大学, 2008.
- [32] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, *et al.* The balance between the *MIR164a* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2929–2945.
- [33] Kim J H, Woo H R, Kim J, *et al.* Trifurcate feed forward regulation of age-dependent cell death involving *miR164* in Arabidopsis [J]. *Science*, 2009, 323(5917): 1053–1057.
- [34] Guo H S, Xie Q, Fei J F, *et al.* *MicroRNA164* directs NAC1 mRNA cleavage to downregulate auxin signals for lateral root development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1–11.
- [35] Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, *et al.* Redundancy and specialization among plant microRNAs; role of the *MIR164* family in developmental robustness [J]. *Development*, 2007, 134(6): 1051–1060.