

大豆 *gma-miR1514b* 生物信息学分析及人工 microRNA 植物表达载体构建

倪志勇,于月华,陈全家,曲延英

(新疆农业大学 农学院/新疆农业大学农业生物技术重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:MicroRNAs 在植物发育与逆境响应等多个方面具有重要的调节作用。本研究采用生物信息学方法分析 *gma-miR1514b* 的靶基因和启动子中的顺式作用元件。PLACE 和 PlantCARE 启动子在线预测工具分析表明 *gma-miR1514b* 启动子序列具有 TATA-box、CAAT-box 基本的顺式作用元件和一些参与光、逆境和植物激素应答相关的顺式作用元件。PMRD 软件预测获得 5 个 *gma-miR1514b* 靶基因,分别与拟南芥 *CA2*、*NTL9* 和 *ANAC014* 基因同源。通过重叠 PCR 方法替换拟南芥 *At-MIR319* 的成熟链和互补链序列,构建含有 *amiR1514b* 前体的植物表达载体 *amiR1514b*-pCAM-BIA3301。

关键词:大豆;*gma-miR1514b*;amiRNA;启动子

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0046

Bioinformatic Analysis of *gma-miR1514b* and Construction of Its Artificial miRNA Plant Expression Vectors

NI Zhi-yong, YU Yue-hua, CHEN Quan-jia, QU Yan-ying

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University / Key Laboratory of Agricultural Biological Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: MicroRNAs play fundamental regulatory roles in various aspects of plant development and adaptive responses to stresses. In this study, the target gene and the promoter of *gma-miR1514b* gene were predicted and analyzed by bioinformatics methodology. PMRD database analysis showed that precursor sequence length of *gma-miR1514b* was 109 bp, located in soybean 1 497 668 – 1 497 776[+] of chromosome 17, and its mature sequence length was 21 bp. The predicted transcription start site of *gma-miR1514b* was found within 762 bp upstream of the precursor sequence. The database of PLACE and PlantCARE analysis showed that the promoter sequence contains basic elements TATA-box, CAAT-box and some cis-acting elements involved in response to light, stresses and plant hormones. PMRD software analysis showed that 5 transcripts were targeted by *gma-miR1514b*, these targets were homologous with *CA2*, *NTL9* and *ANAC014* genes in *Arabidopsis*, respectively. The *amiR1514b* sequence was engineered into the miRNA and miRNA* of *At-MIR319* using overlapping PCR and the *amiR1514b* backbone was transferred into the plant expression vector pCambia3301.

Keywords: Soybean; *gma-miR1514b*; amiRNA; Promoter

MicroRNAs(miRNAs)是大小为 21 nt 左右的非编码 RNAs,来源于能够形成茎环结构的单链 RNA 前体^[1-2]。在植物中,miRNAs 在转录和转录后水平通过介导基因沉默在不同的发育阶段发挥重要的作用^[3]。在植物中,有一些 miRNAs 家族在物种间是保守的,另外,植物中还有一些 miRNAs 家族是物种特有的 miRNAs,这些特有的 miRNAs 可能在不同物种特有的发育进程中具有重要的功能^[4]。

miRNAs 通过负调控其靶基因来行使其生物学功能,对 miRNAs 靶基因的功能鉴定有助于解析 miRNAs 的生物学功能。相比动物,植物 miRNAs 与靶基因结合位点互补程度高,因此利用生物信息学方法,能够有效预测植物 miRNAs 的靶基因。miRNA 启动子是 RNA 聚合酶 II 型启动子^[5-6],对 miR-

NA 启动子中的顺式作用元件进行分析,能够推测 miRNA 的表达特性,通常采用生物信息学方法分析启动子中的顺式作用元件。例如,李永光等^[7]通过生物信息学方法预测了大豆 *gma-miR1508a* 的靶基因并发现其启动子序列中含有多种非生物胁迫应答元件。

人工 miRNA 技术通过替换内源 miRNA 前体的 miRNA-miRNA* 的序列,利用内源 miRNA 序列的结构特征来产出 21 bp 目的 miRNA^[8]。利用人工 miRNA 技术构建植物表达载体可以在模式植物拟南芥中产生其他物种的 miRNA^[9]。例如,陈锐等^[10]通过重叠 PCR 的方法,利用拟南芥 *miR319* 前体作为构建 amiRNA 的骨架,成功构建了野生大豆 miRNA(*gso8*)的 amiRNA 植物表达载体。谢丽华

收稿日期:2015-02-15
基金项目:中国博士后科学基金(2015M582741);国家自然科学基金(31360264);新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2014I015);新疆农业大学校前期资助课题(XJAU201313);新疆维吾尔自治区优秀博士后普通资助。
第一作者简介:倪志勇(1981-),男,博士,副教授,主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail:nizhiyong@126.com。

等^[11]构建了青杨盐胁迫相关 *ptc-miR213* 的人工 miRNA 植物表达载体 pCAM2300-ami213,获得了过表达 amiR213 的转基因拟南芥植株。杨惠琴等^[12]构建了青杨 *ptc-miR801* 的 amiRNA 载体,研究发现过表达 *ptc-miR801* 提高转基因拟南芥的耐盐能力。

gma-miR1514b 是大豆特异的 miRNA,本研究利用生物信息学方法分析 *gma-miR1514b* 的前体序列、预测 *gma-miR1514b* 启动子中存在的顺式作用元件和其靶基因并构建了人工 miRNA 植物表达载体,为进一步转化植物研究 *gma-miR1514b* 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *gma-miR1514b* 序列的获得

通过植物 miRNA 数据库 PMRD^[13] (plant microRNA database, <http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>) 获得 *gma-miR1514b* 的前体序列和上游 3 000 bp 的启动子序列。

1.2 *gma-miR1514b* 启动子序列分析

使用 softberry 网站中的在线软件 TSSP(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 预测 *gma-miR1514b* 启动子可能的转录起始位点。在 PlantCARE 网站^[14] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 和 PLACE^[15] (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 在线分析启动子区域存在的可能的基本启动子元件和顺式作用元件。

1.3 *gma-miR1514b* 的靶基因预测

利用在线网站 psRNATarget^[16] (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarge>) 预测 *gma-miR1514b*

的靶基因,选取大豆基因组数据库 (*Glycine_max_Williams_82* 8x Release v1.01, cDNA, released 10/08/2008) 进行靶基因筛选,选取罚分 2 以下的基因作为 *gma-miR1514b* 可能的靶基因。通过比对拟南芥中的同源基因对靶基因进行功能注释。

1.4 植物表达载体构建

根据大豆 *gma-miR1514b* 成熟的 miRNA 序列,利用 WMD3 网站中在线 Oligo 程序 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Oligo;project=stdwmd>) 设计置换 PCR 引物,用来扩增 *gma-miR1514b* 的 miRNA 和 miRNA* 序列。在拟南芥 *At-miR319* 前体扩增引物 319-3301-F/R 两端分别加入 *Nco* I 和 *Bgl* II 限制性内切酶位点,以便亚克隆至植物表达载体 pCAMBIA3301 中,引物序列见表 1。

以含有 *At-miR319* 前体序列的 *At-miR319*-pGM-T 质粒为模板,使用 LA-Taq 聚合酶,用 319-3301-F 和 *gma-miR1514b*-IV miR* a, *gma-miR1514b*-III miR* s 和 *gma-miR1514b*-II miR-a, *gma-miR1514b*-I miR-s 和 319-3301-R 3 组引物分别扩增 a, b, c 片段,凝胶回收 3 条条带,以 3 条条带的混合物为模板,使用 LA-Taq 聚合酶,用 319-3301-F/R 引物扩增置换后的 amiRNA 的前体片段,PCR 扩增体系和程序参考 Schwab^[9] 的方法。凝胶回收 amiRNA 前体片段,通过 TA 克隆,连接至 pJET1.2 载体中,经菌液 PCR 和测序验证 amiRNA 前体序列的正确性。

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 双酶切 a-miR1514b-pJET1.2,将凝胶回收的 *amiR1514b* 片段连接到以相同酶切的 pCAMBIA3301 载体中,经菌液 PCR 和测序检测 amiR1514b-pCAMBIA3301 植物表达载体的正确性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

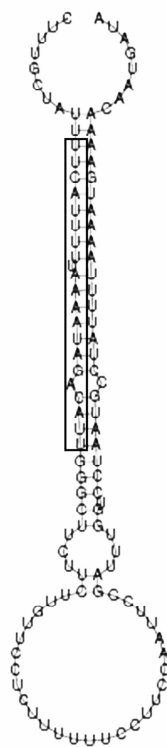
引物 Primers	引物序列 Sequences of primer
<i>gma-miR1514b</i> -I miR-s	5'-GATTCATTTTTTAAATAGACATTTCTCTTTTGTATTCC-3'
<i>gma-miR1514b</i> -II miR-a	5'-GAAATGCTCATTTTTTAAATGAATCAAAGAGAATCAATGA-3'
<i>gma-miR1514b</i> -III miR* s	5'-GAAACGTCTATTTTATAAATGATTCACAGGTCGTGATATG-3'
<i>gma-miR1514b</i> -IV miR* a	5'-GAATCATTTTATAAAATAGACGTTTCTACATATATATTCCT-3'
319-3301-F	5'-TAACCATGCGCAAACACACGCTCGGACGCATATT-3'
319-3301-R	5'-TTTAGATCTCATGGCGATGCCTTAAATAAAGATAAACCC-3'

2 结果与分析

2.1 大豆 *gma-miR1514b* 的序列分析

PMRD 数据库中的 *gma-miR1514b* 的前体序列长

度为 109 bp,定位于大豆 17 号染色体 1 497 668 ~ 1 497 776 [+]。 *gma-miR1514b* 的成熟序列长度为 21 bp(图 1)。



方框表示成熟序列。
The block was the mature sequence.

图1 *gma-miR1514b* 前体茎环结构

Fig. 1 The miRNA precursor of *gma-miR1514b* stem-loop structure

表2 *gma-miR1514b* 启动子中推测的顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of putative cis-acting elements of the *gma-miR1514b* promoter

顺式作用元件 Cis-acting element	位置(链) Location (strand)	功能 Function	数目 Number
5' UTR Py-rich stretch	- 1364(+)	提高转录水平元件	1
ABRE	- 1311(-), - 2056(-)	脱落酸应答元件	2
ACE	- 1281(-), - 1429(+), - 1729(-)	参与光应答顺式作用元件	3
ARE	- 572(-), - 1307(-), - 1144(+)	厌氧诱导所需的元件	3
Box-W1	- 826(+), 1884(+)	真菌诱导应答元件	2
CAAT-box	- 831(+), - 882(+), - 1043(-), - 1207(+), - 1223(+), - 1275(+)	启动子和增强子普遍存在的元件	6
CAT-box	- 1179(-)	分生组织表达特异元件	1
CCAAT-box	- 489(+), - 2139(+)	MYBHv1 结合位点	2
TGACG-motif	- 544(-), - 1046(+)	茉莉酸甲酯应答元件	2
ERE	- 208(-)	乙烯应答元件	1
G-box	- 1311(+), - 2057(+)	参与光应答顺式作用元件	2
GAG-motif	- 455(+), - 1447(-), - 1367(-), - 1982(-)	部分光应答元件	4
GA-motif	- 1673(-)	部分光应答元件	1
GARE-motif	- 841(-), - 1451(-)	赤霉素应答元件	2
GCN4_motif	- 312(-), - 2172(+)	参与胚乳表达顺式元件	2
GT1-motif	- 941(+), - 1158(-), - 1150(+), - 968(-), - 1157(-)	光应答元件	5

2.2 大豆 *gma-miR1514b* 启动子中顺式作用元件分析

从 PMRD 数据库中获得 *gma-miR1514b* 上游 3 000 bp 的启动子序列,采用在线软件 TSSP 预测发现 *gma-miR1514b* 启动子的转录起始位点位于前体序列上游 762 bp 处。选取转录起始位点上游2 238 bp 的启动子序列分析其含有的顺式作用元件,综合 PlantCARE 和 PLACE 网站的分析结果发现 *gma-miR1514b* 启动子中含有基本启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box。与激素应答相关元件包括 2 个脱落酸应答元件 ABRE, 2 个茉莉酸甲酯应答元件 TGACG-motif, 1 个乙烯应答元件 ERE, 2 个赤霉素应答元件 GARE-motif 和 1 个水杨酸应答元件 TCA-el-ement。与逆境应答相关元件包括厌氧诱导所需的 ARE 元件,冷和脱水应答调控元件 C-repeat/DRE, 热激应答元件 HSE, 低温应答元件 LTR, 参与干旱诱导的 MYB 结合元件 MBS 等非生物胁迫应答元件和真菌诱导应答元件 Box-W1, 防御和逆境应答元件 TC-rich repeats, 伤害和病原菌应答元件 GCC-box 等生物胁迫应答元件。*gma-miR1514b* 启动子中还含有多个光应答相关元件、组织特异表达元件及昼夜节律控制等顺式作用元件(表 2)。

续表 2

顺式作用元件 Cis-acting element	位置(链) Location(strand)	功能 Function	数目 Number
HSE	- 1005(-), - 1759(-), - 2178(+)	热激应答元件	3
LTR	- 6(-)	低温应答元件	1
MBS	- 709(+), - 1379(+), - 911(+)	参与干旱诱导的 MYB 结合元件	3
I-box	1748(+)	部分光应答元件	1
Nodule-site2	- 720(+)	根瘤特异因子结合位点	1
O2-site	1668(-),2008(-),1749(+)	玉米醇溶蛋白代谢调控顺式元件	3
Sp1	- 578(-), - 2024(-), - 2163(+)	光应答元件	3
Skn-1_motif	- 1579(+)	胚乳表达所需元件	1
TC-rich repeats	- 52(+), - 1330(+)	防御和逆境应答元件	2
TCT motif	- 1406(+)	部分光应答元件	1
TCA-element	- 1673(+)	参与水杨酸应答顺式作用元件	1
Circadian	- 1195(-)	昼夜节律控制元件	1
chs-Unit1 m1	- 1312(+)	部分光应答元件	1
as-2-box	- 635(-)	根特异表达和光响应相关元件	1
TATA-box	132(-), - 394(+), - 591(+), - 889(+), - 949(+), - 1015(-), - 1079(+), - 1088(+), - 1116(+), - 1153(+), - 1156(-), - 1299(+), - 1397(+), - 1435(-), - 1719(+), - 1828(-)	据转录起始位点 30 个碱基的启动子中心元件	16
C-repeat/DRE	- 1957(+)	冷和脱水应答调控元件	1
GCC-box	- 2040(+)	伤害和病原菌应答元件	1

2.3 大豆 *gma-miR1514b* 的靶基因预测及分析

通过 psRNATarget 在线预测 *gma-miR1514b* 的靶基因,选取罚分 2 分以下的基因,共获得 5 个可能的靶基因(表 3),其中 *Glyma06g19400* 同源拟南芥碳酸酐酶 2 基因(*AT5G14740*),该蛋白定位与细胞质中,在黄化幼苗中表达,可能在非光合作用中具有一定的功能^[17-18]。*Glyma07g05360*、*Glyma07g05370* 和 *Gly-*

ma16g01930 这 3 个靶基因都与拟南芥 *NTL9* 基因(*AT4G35580*)同源,该基因编码 1 个钙调素结合 NAC 蛋白,在蛋白的羧基端包含 1 个钙调素结合功能域,该蛋白是钙调素调控转录抑制子^[19-20]。*Gly-ma16g01940* 与拟南芥 *ANAC014* 基因(*AT1G33060*)同源,是一个序列特异结合转录因子,参与多个发育进程,是转录调控子^[21-22]。

表 3 *gma-miR1514b* 靶基因预测

Table 3 Target genes prediction of *gma-miR1514b*

靶位点 Targets	罚分 Expection	同源基因 Homologous genes	靶位点类型 Target description
Glyma06g19400	2.0	AT5G14740	CA2 (碳酸酐酶 2); 碳酸脱水酶/锌离子结合
Glyma07g05360	1.5	AT4G35580	NTL9 (NAC 转录因子 9); 转录因子
Glyma07g05370	1.5	AT4G35580	NTL9 (NAC 转录因子 9); 转录因子
Glyma16g01930	1.5	AT4G35580	NTL9 (NAC 转录因子 9); 转录因子
Glyma16g01940	1.5	AT1G33060	ANAC014, 无顶端分生组织 (NAM) 家族蛋白

2.4 植物表达载体 *amiR1514b*-pCAMBIA3301 的构建

通过置换 PCR 方法,分别获得了置换 *At-miR319* 的 miRNA 和 miRNA* 序列的 *gma-miR1514b* 3 个片段 a、b 和 c,大小分别为 118,176 和 178 bp (图 2)。以 a、b 和 c 3 个片段混合进行 PCR 扩增获得大小为 422 bp 的 *amiR1514b* 前体序列(图 3),将

amiR1514b 前体序列亚克隆至 pJET1.2 载体中,菌液 PCR 检测表明能够从重组菌液中扩增出大小一致的条带(图 4),经测序比对表明获得了替换 *At-miR319* 的 miRNA 和 miRNA* 序列的 *amiR1514b*。将 *amiR1514b* 前体序列酶切后亚克隆至植物表达载体 pCAMBIA3301 载体中,菌液 PCR 检测表明能够扩增出 422 bp 的 *amiR1514b* 片段(图 5),测序结果

表明 *amiR1514b* 序列已经连入体 pCAMBIA3301 载体。

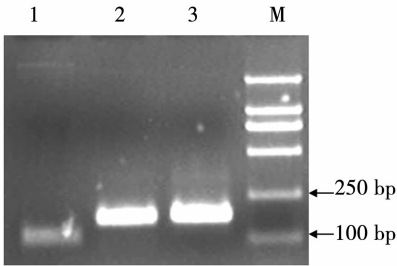


图 2 重叠 PCR 扩增产物
Fig. 2 Over-lapping PCR product

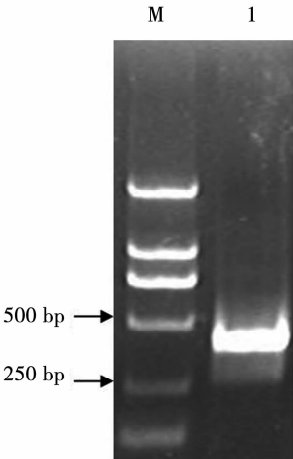


图 3 大豆 *gma-miR1514b* 前体序列的扩增
Fig. 3 Amplification of the *gma-miR1514b* precursor sequence

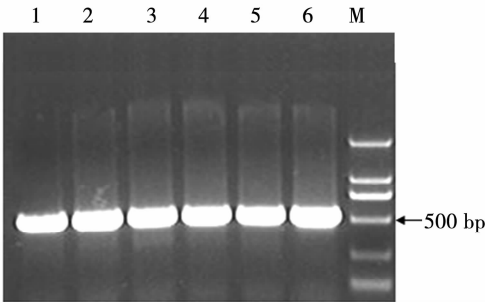


图 4 PCR 检测 *amiR1514b*-pJET1.2 重组质粒
Fig. 4 PCR detection recombinant plasmid of *amiR1514b*-pJET1.2

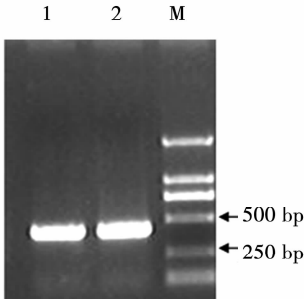


图 5 PCR 检测 *amiR1514b*-pCAMBIA3301 重组质粒
Fig. 5 PCR detection recombinant plasmid of *amiR1514b*-pCAMBIA3301

3 结论与讨论

本研究对 *gma-miR1514b* 的启动子分析发现在转录起始位点上游区域中含有多种激素、光和逆境应答元件,暗示 *gma-miR1514b* 可能参与对这些外界信号的应答。类似的,李永光等^[7]通过预测发现 *gma-miR1508a* 的启动子中含有 ABA、干旱和低温应答元件。*gma-miR160o* 启动子含有生长素、脱落酸和赤霉素激素应答元件,热激、干旱、低温、伤害和病原菌等逆境应答元件,还有组织特异表达元件和光应答元件^[23]。DRE 和 ABRE 元件及其结合这 2 个元件的转录因子,在植物对非生物胁迫的应答中具有重要的功能,一些受干旱胁迫诱导表达的基因和 miRNAs,其上游启动子中含有 DRE 元件,例如,水稻 *miR169g* 受干旱胁迫的诱导,序列分析发现在 *miR169g* 上游启动子区存在 2 个 DRE 应答元件^[24]。本研究发现 *gma-miR1514b* 启动子中含有 1 个 DRE 元件,*gma-miR1514b* 是否与水稻 *miR169g* 类似受干旱胁迫的诱导需要进一步的试验证明。

本研究预测了 *gma-miR1514b* 的靶基因,其靶基因主要为 NAC 转录因子家族成员,NAC 转录因子主要参与调控植物的生长发育和对逆境胁迫的应答,*gma-miR1514b* 的 3 个靶基因 *Glyma07g05360*、*Glyma07g05370* 和 *Glyma16g01930* 都与拟南芥 *NTL9* 基因 (*AT4G35580*) 同源,该基因受渗透胁迫的诱导表达^[25],这暗示 *gma-miR1514b* 可能参与调控 3 个靶基因对渗透胁迫的应答。然而,预测的这些 *gma-miR1514b* 的靶基因,仍需要通过降解组测序或 5'-RACE 方法来验证其真实性。本研究构建了 *gma-miR1514b* 的 amiRNA 表达载体,下一步将转化拟南芥和大豆来鉴定 *gma-miR1514b* 的生物学

功能。

参考文献

[1] Chen X M. Small RNAs and their roles in plant development[J]. Annual Rreview of Cell and Developmental Biology, 2009, 25:21-44.

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

[3] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science, 2002, 297(5589):2053-2056.

[4] Hu Z, Jiang Q Y, Ni Z Y, et al. Analyses of a *Glycine max* degradome library identify microRNA targets and microRNAs that trigger secondary siRNA biogenesis[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(2):160-176.

[5] Xie Z X, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes[J]. Plant Physiology, 2005,138(4):2145-2154.

[6] Zhou X, Ruan J, Wang G. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species[J]. Plos Computational Biology, 2007, 3(3): e37.

[7] 李永光,艾佳,王涛,等. 大豆 *gma-miR1508a* 靶基因预测及功能分析[J]. 大豆科学,2014,33(4):479-482. (Li Y G, Ai J, Wang T, et al. The target genes prediction and analysis of *gma-miR1508a*[J]. Soybean Science, 2014, 33(4):479-482.)

[8] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, et al. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species[J]. The Plant Cell, 2006,18(5):1134-1151.

[9] Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2006, 18(5):1121-1133.

[10] 陈锐,胡正,张辉. 小分子 RNA 表达载体构建的新方法—MicroRNA 前体 PCR 置换法[J]. 生物技术通报,2010(7):101-105. (Chen R, Hu Z, Zhang H. A novel method for constructing small RNA expression vector-artificial pre-MircoRNA[J] Biotechnology Bulletin, 2010(7):101-105.)

[11] 谢丽华,蒋晶,刘明英,等. *ptc-miR213* 的人工 microRNA 植物表达载体的构建及遗传转化[J]. 林业科学研究,2013,26(1):29-33. (Xie L H, Jiang J, Liu M Y, et al. Construction of artificial miRNA of *ptc-miR213* expression vector and transformation into *Arabidopsis thaliana*[J]. Forest Research, 2013,26(1):29-33.)

[12] 杨惠琴,蒋晶,刘明英,等. *ptc-miR801* 人工 microRNA 表达载体构建及功能初步研究[J]. 植物研究,2013,33(5):599-604. (Yang H Q, Jiang J, Liu M Y, et al. Construction of expression vector of *ptc-miR801* gene and function analysis[J]. Bulletin of Botanical Research, 2013,33(5):599-604.)

[13] Zhang Z, Yu J, Li D, et al. PMRD: Plant microRNA database [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(Database issue): D806-D813.

[14] Lescot M, Dehais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1):325-327.

[15] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1):297-300.

[16] Dai X, Zhao P X. psRNA target: A plant small RNA target analysis server[J]. Nucleic Acids Research, 2011 (Web Server issue): W155-159.

[17] Wang M, Zhang Q, Liu F C, et al. Family-wide expression characterization of *Arabidopsis* beta-carbonic anhydrase genes using qRT-PCR and Promoter::GUS fusions[J]. Biochimie, 2014, 97:219-227.

[18] Villarreal F, Martín V, Colaneri A, et al. Ectopic expression of mitochondrial gamma carbonic anhydrase 2 causes male sterility by another indehiscence[J]. Plant Molecular Biology, 2009,70(4):471-485.

[19] Block A, Toruño T Y, Elowsky C G, et al. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the *Arabidopsis* transcription factor NTL9[J]. New Phytologist, 2014, 201(4):1358-1370.

[20] Kim H S, Park B O, Yoo J H, et al. Identification of a calmodulin-binding NAC protein (CBNAC) as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(50):36292-36302.

[21] Bezhani S, Winter C, Hershman S, et al. Unique, shared, and redundant roles for the *Arabidopsis* SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED[J]. The Plant Cell, 2007,19(2):403-416.

[22] Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Research, 2003,10(6):239-247.

[23] 倪志勇,于月华,刘超,等. 大豆 *gma-miR160o* 启动子的克隆及植物表达载体构建[J]. 华北农学报,2015,30(1):19-23. (Ni Z Y, Yu Y H, Liu C, et al. Isolation of *gma-miR160o* promoter from *Glycine max* and construction of its plant expression vectors[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2015,30(1):19-23.)

[24] Zhao B, Liang R, Ge L, et al. Identification of drought-induced microRNAs in rice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2007,354(2):585-590.

[25] Yoon H K, Kim S G, Kim S Y, et al. Regulation of leaf senescence by NTL9-mediated osmotic stress signaling in *Arabidopsis* [J]. Molecular Cells, 2008,31:25(3):438-445.