

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.04.001

# 基于硝态氮或铵态氮条件下杨树根尖 miRNAs 特征分析

阚东旭<sup>1,2</sup>, 逯岩<sup>1</sup>, 吴江婷<sup>1</sup>, 陈昕<sup>1</sup>, 石文广<sup>1</sup>, 周婧<sup>1\*</sup>

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局森林培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

2. 林木遗传育种国家重点实验室, 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** [目的] 通过小 RNAs 高通量测序技术, 在硝态氮或铵态氮处理下, 对杨树根尖差异表达 miRNAs 及其靶基因调控机制进行了研究, 分析和描述了杨树根尖生长和形态特征的规律, 为进一步筛选和鉴定硝态氮或铵态氮吸收利用效率高的林木新品种提供依据。[方法] 以灰杨水培苗根尖为研究对象, 应用高通量测序技术进行小 RNA 文库构建, 获得 miRNAs 表达谱, 鉴定差异表达 miRNAs, 同时利用降解组测序技术鉴定 miRNAs 靶基因, 并对差异表达靶基因进行功能注释以及代谢通路富集等分析。最后通过联合分析, 阐明不同氮形态处理下, 灰杨根尖 miRNA-靶基因调控网络。[结果] 从 2 种不同氮形态处理杨树根尖 miRNAs 文库中鉴定出 523 个已知 miRNAs 和 42 个新 miRNAs, 其中, 有 96 个 miRNAs 显著差异表达。与硝态氮处理相比, 铵态氮处理下有 44 个 miRNAs 上调表达, 52 个下调表达, 其中, vvi-MIR399d-p3\_1ss13GA 上调倍数最大, 新的 miRNA PC-5p-35885\_222 下调最显著。对 miRNAs 靶基因进行 KEGG 通路富集分析表明, 部分显著差异表达靶基因参与杨树根尖氮响应, 从而影响杨树根尖生长发育和形态特征。利用 RT-qPCR 对 7 组随机挑选的 miRNA-靶基因进行验证, 结果与测序数据一致, 说明测序结果可靠。[结论] miRNAs 及其靶基因在不同氮形态处理后对杨树根尖氮响应起着重要的调控作用, 从而使硝态氮处理下的灰杨根长比铵态氮处理的几乎长 1 倍。

**关键词:** 硝态氮; 铵态氮; miRNA; mRNA; 杨树; 根

**中图分类号:** S718.46

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2021)04-0001-12

杨树 (*Populus L.*) 作为一种快速生长的木本植物, 是我国最主要的速生丰产林树种之一<sup>[1]</sup>。杨树具有速生、易繁殖、适应性强和生产力高等特性, 在木材加工、碳汇造林、制浆造纸和生物燃料等方面发挥着重要作用<sup>[2-4]</sup>。目前, 我国许多杨树人工林种植园生长在氮素贫瘠的地区<sup>[5]</sup>, 易导致杨树人工林生产力低下, 原材料利用率不高, 产品质量差等问题。因此, 开展杨树根系响应氮素分子调控机制的研究, 可以实现杨树人工林氮素高效利用的经济效益, 意义重大。

氮素是植物生长发育所必需的大量矿质营养元素之一, 是蛋白质、核酸、叶绿素等重要物质的组成成分<sup>[6]</sup>。植物根系是吸收硝态氮或铵态氮的主要器官, 良好的根系形态对植物氮素高效吸收利用至关重要<sup>[7]</sup>。有研究表明, 植物可通过对外界不同氮形态响应做出反应, 从而改变根系形态并逐渐做出相应的适应<sup>[8-12]</sup>。Wei 等研究表明, 杨树根系形态对低硝态氮处理响应的初期表现是加快增加主根长度, 随后加速侧根增殖, 在低硝态氮处理 2~4 d 后, 根系生物活性显著增加, 其根长和侧根数显著

收稿日期: 2020-11-10 修回日期: 2021-03-01

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2018SY005); 国家自然科学基金青年项目 (31500507); 中国林科院基本科研业务费专项资金项目青年配套项目 (CAFYBB2016QB005)

\* 通讯作者: 周婧, 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 林木分子遗传育种。邮箱: gaha2008@126.com

高于对照<sup>[5]</sup>。类似的动态响应在玉米 (*Zea mays* L.) 中也有报道<sup>[13]</sup>。上述研究结果表明:植物根系有能够根据不同氮形态供应而改变其形态的能力<sup>[14]</sup>。

除植物根系形态发生变化外,分子水平调节在植物响应不同氮形态吸收同化过程中也发挥着重要作用,特别是来自具有调控功能的 miRNAs 的调节<sup>[15-16]</sup>。miRNAs 是一类广泛存在于真核生物中,长约 18~24 个碱基 (nt) 的高度保守小分子 RNAs<sup>[17]</sup>。利用小 RNA 高通量测序技术并结合生物信息学分析,前人研究中已鉴定出大量参与氮素吸收同化响应相关的 miRNAs<sup>[16, 18-19]</sup>,其中,部分 miRNAs 也参与了植物根生长和发育过程<sup>[16, 20-21]</sup>。如在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 根中柱鞘细胞中,5 mmol·L<sup>-1</sup> 硝态氮可以抑制 miR167 的表达,从而提高靶基因 *auxin response factor 8* (*ARF8*) 的表达水平,促进拟南芥侧根起始和随后的萌发<sup>[20,22]</sup>。在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中,miR396 的靶基因 *growth-regulating factor 4* (*GRF4*) 能够促使水稻根系吸收铵态氮从而改变水稻根系结构<sup>[23]</sup>;而 miRNA 调控机制在不同氮形态处理杨树根尖上存在怎样的差异表达模式尚不清楚,值得深入研究。

综上所述,本研究以灰杨 (*Populus × canescens*) 根尖为试材,利用小 RNAs 高通量测序技术,分析根尖差异表达的 miRNAs,并结合降解组和转录组测序结果,分析 miRNAs 靶基因的差异表达模式,阐明杨树根尖对硝态氮或铵态氮处理条件下 miRNAs 及其靶基因的表达调控机制。本研究成果可为培育氮素吸收利用效率高的林木奠定理论基础,具有理论与实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

将灰杨组培苗在组培室(白天/黑夜温度 25℃/18℃,相对湿度 50%~60%,光照长度 14 h,光照强度 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)中培养 4 周。随后,将生根的灰杨植株种植在 10 L 的花盆里进行砂培。每株植株隔天浇 50 mL Long Ashton (LA) 营养液(0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、0.9 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、0.3 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>、0.6 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、42 μmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10 μmol·L<sup>-1</sup> Fe-EDTA、2 μmol·L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>、10 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、7 μmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>、0.05 μmol·L<sup>-1</sup> CoSO<sub>4</sub>、0.2 μmol·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> 和 0.2 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>, pH 5.5)。砂培植株在

温室(与组培室气候条件相同)中培养 14 d 后,具有相似高度(株高约 30 cm)的植株被选择并分成 2 组(每组 24 株植物)。水培 1~2 周后,将这 2 组植株移植到分别添加等量氮供应的 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (硝态氮)和 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (铵态氮)代替 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的改良 LA 营养液中进行水培,培养时间为 10 d。在处理 10 d 后对其进行根系形态特征分析,然后选取根尖 40 mm 进行收获。所有收获样品迅速置于液氮中,放于 -80℃ 冰箱备用。为了获得足够的材料进行进一步分析,将 8 株植物的样本均匀混合作为一个重复,每种处理水平 3 个生物学重复。

### 1.2 试验方法

1.2.1 根系形态特征分析 试验苗进行硝态氮或铵态氮处理后,对灰杨根系形态构型进行监测,包括测量根系长度,二级可见侧根发生位置等指标。

1.2.2 不同处理水平根尖小 RNA 测序 不同处理水平根尖小 RNAs 测序按照 Illumina 公司提供的标准步骤执行。简单来说,将 2 种不同氮形态处理下的样品,每个处理 3 个重复分别利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNAs (TRK1001, 联川生物技术公司,杭州,中国),将提取的总 RNAs 质量检测后,利用 miRNA 特有的 5'端磷酸基团和 3'端羟基基团属性,将一个腺苷化单链 DNA 3'接头和 5'接头相继连接到小 RNAs 上,通过与 3'端互补的 RT 引物进行反转录反应,对反转录产生的 cDNA 序列进行 PCR 扩增。随后通过 6% polyacrylamide Tris-borate-EDTA 切胶回收的方式对 140~160 bp 长度范围的 PCR 产物进行胶回收,最后利用杭州联川生物技术公司 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序技术进行小 RNA 测序分析。

1.2.3 miRNAs 测序结果分析 将测得的 RNAs 序列使用联川生物技术公司开发的软件进行分析。首先,去除低质量的序列,保留干净的唯一的序列进行分析,将剩余序列比对 RFam 数据库和重复序列数据库用以去除 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 等,过滤后的数据使用已有的灰杨基因组数据库 (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>)、miRNAs 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 进行比对,筛选出已知 miRNAs。针对新的 miRNAs 序列,利用 miRNA 前体的标志性发夹结构,通过 Mfold 软件 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) 分析 RNA 二级结构,鉴定新的

miRNAs。

1.2.4 miRNAs 靶基因分析 把等量的每个处理水平的 3 个重复样品合并, 共 2 个处理水平的合并样品利用联川生物技术公司 Illumina HiSeq2500 技术平台进行降解组测序, 采用 CleaveLand 软件 (3.0.1 版本) 预测 miRNAs 的靶基因。为了进一步挖掘靶基因的表达水平, 6 个 cDNA 文库被构建, 利用转录组数据 Hiseq 测序平台分析相关 miRNAs 靶基因的表达模式, 同时结合生物信息学 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 软件和 MapMan 软件, 分析差异表达 miRNAs 靶基因的生物学功能。

1.2.5 荧光定量 PCR 引物设计及合成 根据灰杨数据库, 利用 Primer Premier 3.0 软件设计引物并由上海生工生物工程有限公司合成相关 miRNAs 和靶基因的引物。5.8s rRNA 和 Actin 分别作为 miRNAs 和靶基因的内参基因。序列见表 1。

1.2.6 统计分析 使用 Statgraphics 软件 (STN, St Louis, MO, USA) 进行数据统计分析。在进行统计分析之前, 先对数据进行正态性检验。所有数据均采用单因素方差分析 (ANOVA), 以  $P < 0.05$  作为统计意义上的显著水平。

利用 transcripts per million (TPM) 对 miRNAs 表达水平进行定量。使用 miRNA 在铵态氮处理下的 TPM 除以硝态氮处理下的 TPM 来计算 miRNA 的差异倍数 (FC)。差异表达 miRNAs 筛选阈值为  $P < 0.05$ 。

采用 Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped (FPKM) 对靶基因 mRNAs 表达水平进行定量。基于 FPKM 值, 使用 Ballgown package 计算 mRNAs 的差异表达水平。使用 mRNAs 在铵态氮处理下的 FPKM 除以硝态氮处理下 FPKM 来计算这个基因的差异倍数 (FC)。差异表达 mRNAs 筛选阈值为  $\log_2(FC) \geq 1$  或  $\leq -1$ ,  $P < 0.05$ 。

对于 RT-qPCR 的测定, 将 qPCR 得到的 Ct 值进行归一化, 计算 miRNAs 及其靶基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

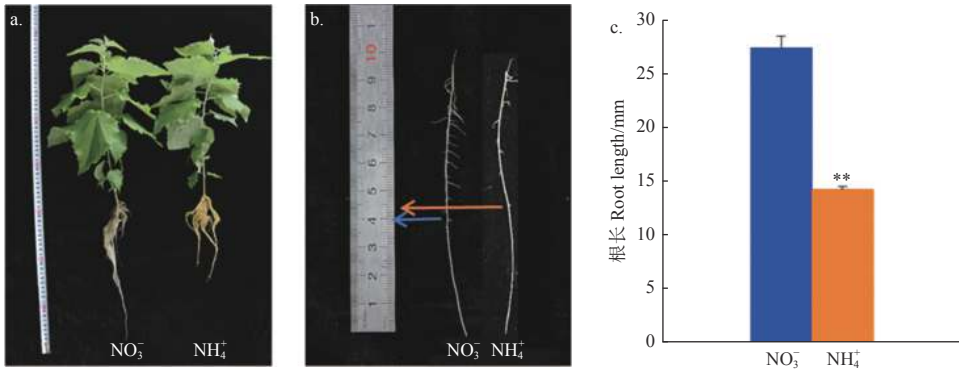
### 2.1 根系形态特征分析

由图 1 可知: 在不同氮形态处理条件下灰杨根的形态特征具有显著差别。测量表明, 硝态氮处理下的根长为 27.5 cm, 比铵态氮处理的 14.3 cm 几乎长 1 倍 ( $p < 0.001$ ), 但 2 种处理水平下其二级侧

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primers used for RT-qPCR

miRNAs/靶基因ID miRNAs/targets ID	引物序列5'-3' Primer sequence 5'-3'
PC-5p-35885_222	TCTACTGAAAGTCAAAGCTAT
ptc-MIR166e-p5	GGATTGTCGCTGGTTCGATG
ptc-MIR166m-p5_1ss9TC	GAATGTCGCCTGACTCGAGAC
ath-miR166e-5p_2ss4AC16AT	GGACTGTTGCTGGCTCGAGG
mtr-miR166e-5p_2ss4AC10GT	GGACTGTTGCTGGCTCGAGG
ptc-MIR1450-p3_2ss19AG21TC	CGGTCAGGTTACACAAGCGAC
ptc-miR6478_R+2_2ss5CT21GA	CCGATCTTAGCTCAGTTGGTAGA
ptc-MIR2111a-p3	GTCCTTGGGTTGCAGATTACC
ptc-MIR2111b-p3	GTCCTTGGGTTGCAGATTACC
vvi-MIR399d-p3_1ss13GA	TCTGCCAAAGGAAATTTGCTC
ptc-miR396g-5p	TTCCACGGCTTCTTGAACCTT
ath-miR858a_L-2R+1	TCGTTGTCTGTTTCGACCTTG
ptc-miR476b_2ss8TC17CT	TAGTAATCCTTCTTTGTAATA
ptc-miR395b	CTGAAGTGTGGGGGAACCTC
PC-3p-42422_177	TTTATGCGTTTTTGCCCTCG
ptc-miR399b	TGCCAAAGGAGATTTGCCCGG
URT primer	由Mir-X miRNA First-Strand Synthesis和SYBR RT-qPCR试剂盒提供
U6 F'/ R'	均由Mir-X miRNA First-Strand Synthesis和SYBR RT-qPCR试剂盒提供
protein binding F'	TGAGATCAGCGAGGGACAAA
protein binding R'	AAGGTTTGAGTGAGCAAGGC
GRF9 F'	TCCCTCCCTCTCTGTCAA
GRF9 R'	CATGATCACCAGCACCAATC
GRF1 F'	TGCTGTTCTTGGCCTGAAC
GRF1 R'	CAATACCACCCTCCACCT
APS2 F'	CCAGAACCTGTCCAGCTTA
APS2 R'	GCTCCCAACACATGCTAG
phosphate 2 F'	AGGAAGAGCTGAGGGAGAGA
phosphate 2 R'	CCTGTGCAACCACCCTTTTG
MYB4 F'	CGCGTGTGGTGATTGTAGAG
MYB4 R'	GTTGCTCTCTGTATGTCGG
ATP binding F'	GCGGGTGAATGAGGCTTTAG
ATP binding R'	GCCTCTGAAACCTTGCCCTC
5.8s rRNA F'	CTCGGCTCTCGCATCGATGA
5.8s rRNA R'	AGACGTGCCCTCGACCAAGA
Actin F'	CCCATTGAGCACGGTATTGT
Actin R'	TACGACCACTGGCATAACAGG



注：a：分别用  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  硝态氮或  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  铵态氮处理 10 天后的灰杨表型。b：二级可见侧根发生的位置距根尖 4 cm；c：根长统计分析。数据以平均值  $\pm$  SEs ( $n = 6$ ) 表示。\*\*代表  $P < 0.001$ 。

Notes: a: Phenotypes of *P. x canescens* cultured under  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  nitrate or  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ammonium for 10 days. b: The secondary visible lateral root were visible around 4 cm from the root tips; c: Statistical analysis of root length. Data are presented as means  $\pm$  SEs ( $n = 6$ ). \*\*:  $P < 0.001$ .

图 1 不同氮形态处理灰杨根系的表型

Fig. 1 Morphological parameters of *P. x canescens* roots with different nitrogen forms

根发生位置比较一致。这说明不同氮形态处理对根系生长发育的影响不同。选取二级侧根形成前的根尖部分 (40 mm) 进行后续分子实验。

## 2.2 miRNAs 深度测序数据分析

基于上述根尖形态特征分析的结果，进行高通量小 RNAs 测序分析。测序结果显示：2 个处理水平的测序分别得到的原始序列读数为 5 752 458 和 7 800 546，进行数据处理和杂质的过滤，去掉低质量序列和 3'、5'缺失序列等，分别获得 1 996 697 和 2 608 788 条干净序列 (表 2)。长度在 18~25 nt 的序列被保留下来做进一步研究。

## 2.3 已知和新的 miRNAs 鉴定

在不同氮形态处理下，共鉴定灰杨 523 个已知的 miRNAs 和 42 个新的 miRNAs (表 3)。研究表明，植物 miRNAs 长度大多在 21 nt 或 22 nt，统计本实验 2 个处理水平 miRNAs 文库中所有 18~25 nt 的 miRNAs 长度，21-nt miRNA 出现频率最高 (图 2)，这说明该测序数据可靠。

## 2.4 不同氮形态处理下灰杨根尖 miRNAs 差异表达

为了解不同氮形态处理下，灰杨根尖对 miRNAs 的响应，对筛选出来的灰杨中已知 miRNAs 和新 miRNAs 的表达量进行计算。分析表明：灰杨根尖共有 96 个 miRNAs ( $p < 0.05$ ) 在不同氮形态处理下展示出不同的表达模式，其中，包括 33 个已知 miRNAs 家族和 9 个新的 miRNAs。相比较于硝态氮处理，铵态氮处理有 44 个上调表达的 miRNAs 和 52 个下调表达的 miRNAs (图 3a)，其中 29 个显著差异表达的 miRNAs ( $p < 0.001$ ) 见表 4。

表 2 小 RNA 文库测序数据统计

Table 2 Distribution of small RNAs in different categories

类别 category	硝态氮 $\text{NO}_3^-$		铵态氮 $\text{NH}_4^+$	
	Total	Unique	Total	Unique
raw reads	11 320 294	2 909 511	12 316 643	3 519 988
valid reads	5 752 458	1 996 697	7 800 546	2 608 788
Rfam	668 833	14 694	817 912	16 666
mRNA	169 342	2 779	343 819	5 169
other Rfam RNA	28 770	1 020	40 909	1 157

注：Rfam代表除miRNAs外许多常见的非编码RNA家族的集合。  
Note: Rfam: collection of many common non-coding RNA families except miRNAs.

表 3 基于高通量测序技术鉴定灰杨根尖已知和新的 miRNAs 数量

Table 3 The number of identified known and novel miRNAs in root tips of *P. x canescens* based on high-throughput sequencing

样本 Samples	已知/新 miRNAs known/ novelmiRNAs	miRNA前体 miRNA Pre	miRNA成熟体 miRNA mature
硝态氮 $\text{NO}_3^-$	已知 Known	460	469
	新的 Novel	37	39
铵态氮 $\text{NH}_4^+$	已知 Known	502	514
	新的 Novel	68	69
合计 Total	已知 Known	523	592
	新的 Novel	42	42



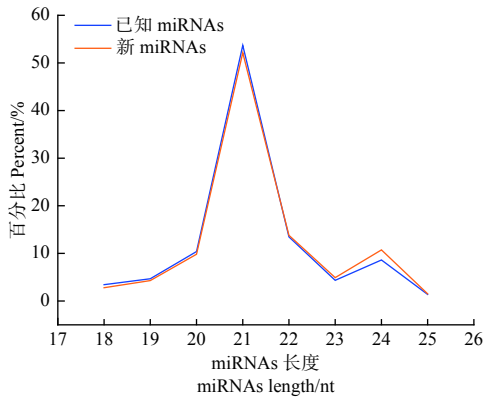


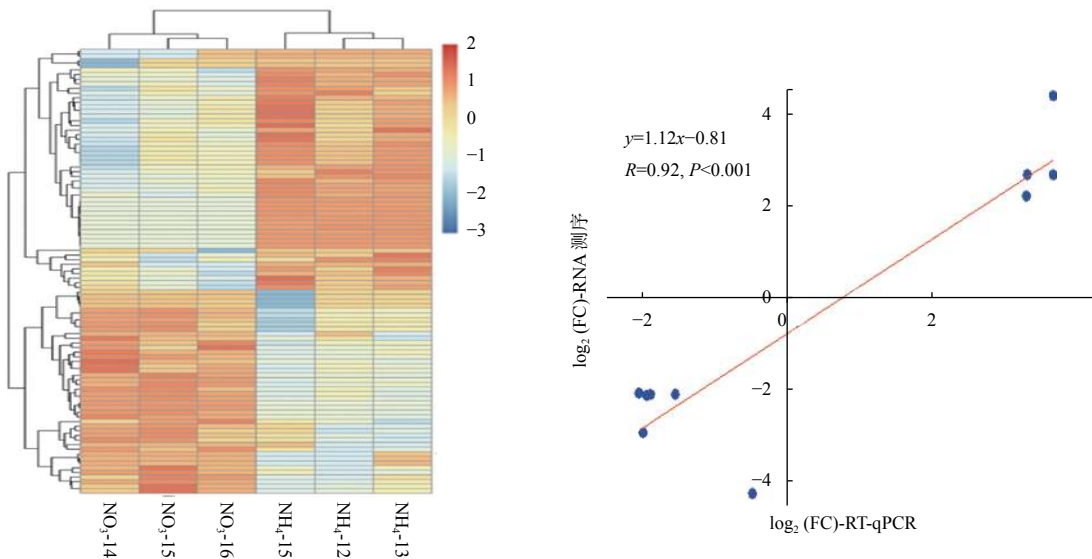
图2 灰杨根尖已知和新 miRNAs 长度分布  
Fig. 2 Lengths of known and novel miRNAs in root tips of *P. × canescens*.

同时, 随机挑选了 10 个显著差异表达 miRNAs, 利用 RT-qPCR 进一步证实了测序结果的可靠性 (图 3b)。虽然 miRNAs 表达水平的差异与测序得到的差异并不一致, 但上调或下调表达的趋势是相似的。2 种技术在比率方面的差异是由 2 种技术的算法和灵敏度的本质不同造成的。总体而言, 本研究测序结果的可靠性较高。

## 2.5 不同氮形态处理下灰杨根尖靶基因的功能

为了进一步了解 miRNAs 的作用, 分别使用等量的总 RNA 样本对硝态氮和铵态氮 2 个混合降解

组池进行测序, 以识别 miRNAs 靶基因。结果表明: 分别有 67.13% 和 65.37% 去除冗余的 reads 可以比对到灰杨数据库中。从降解组中共鉴定出 2729 个靶基因位点, 其中, 2104 个靶基因显著差异表达。为了进一步了解上述靶基因的功能, 对识别出的 2104 个显著差异表达靶基因进行 KEGG 通路分析 (图 4); 同时 MapMan 分析进一步揭示了这些差异靶基因在氮代谢过程中以及植物生长发育过程中参与的各种生物学过程, 如 *ptc-miR166i-p5* 有 4 个靶基因 *potri.015g017500.1/2/3/4* 均属于 NADH 依赖的谷氨酸合成酶 (NADH-dependent glutamate synthase family) 蛋白参与氮代谢过程。*gra-MIR8723b-p3\_2ss6TC21TC* 有 3 个靶基因 *Potri.003G111500.1/2/3* 均作为硝态氮转运体基因 (*nitrate transmembrane transporter1.1/NRT1.1*) 在硝态氮运输中起到关键作用。*ptc-MIR6462a-p5\_1ss14TC* 的靶基因 *Potri.005G079200.1*、*gma-miR6300\_1ss5TG* 和 *gma-miR6300\_R+1\_1ss5TG* 的靶基因 *Potri.001G300900.1/2* 均编码氨基酸运输或代谢相关蛋白, 也对氮代谢有所响应 (表 5); 同时, 与植物生长发育相关的一些 miRNA 的靶基因也相继被发现。如 miR164 家族的多个靶基因均属于 *NAC* 基因家族成员, 其在植物生长发



注: a: 2 种处理下灰杨根尖差异表达 miRNAs 的热图分析。NO<sub>3</sub>-16、NO<sub>3</sub>-15 和 NO<sub>3</sub>-14 代表硝态氮的 3 个生物学重复, NH<sub>4</sub>-13、NH<sub>4</sub>-12 和 NH<sub>4</sub>-15 代表铵态氮处理的 3 个生物学重复。b: 随机选取 10 个差异表达 miRNAs, 利用 RT-qPCR 结果验证测序结果的可靠性。

Notes: a: Heatmap of significantly differentially expressed miRNAs under different nitrogen forms treatments. NO<sub>3</sub>-16, NO<sub>3</sub>-14 and NO<sub>3</sub>-15 represent nitrate three biological replications, NH<sub>4</sub>-12, NH<sub>4</sub>-13, NH<sub>4</sub>-15 represent ammonium three biological replications. b: The validation of 10 significantly differentially expressed miRNAs in root tips of *P. × canescens* by qRT-PCR and sRNA-seq.

图3 不同氮形态处理条件下灰杨根尖差异表达的 miRNAs

Fig. 3 Significantly differentially expressed miRNAs in root tips of *P. × canescens* under different nitrogen forms treatments

表4 29个显著差异表达 miRNAs  
Table 4 twenty-nine significantly differentially expressed miRNAs

miRNAs ID miRNAs ID	miRNAs成熟体序列 sequence of miRNAs	上调/下调 Up/down	$\log_2(\text{FC})$	<i>P</i> -value	是否RT-qPCR验证 RT-qPCR verified
PC-5p-35885_222	TCTACTGAAAAGTGAAAAGCTAT	down	-4.50	0.003 21	是
ptc-MIR166e-p5	GGATTGTCGTCTGGTTTCGATG	down	-3.15	0.007 14	是
ptc-MIR166m-p5_1ss9TC	GAATGTCGCCTGACTCGAGAC	down	-2.32	0.008 37	是
ath-miR166e-5p_2ss4AC16AT	GGACTGTTGTCTGGCTCGAGG	down	-2.30	0.003 18	是
mtr-miR166e-5p_2ss4AC10GT	GGACTGTTGTCTGGCTCGAGG	down	-2.30	0.003 18	是
ptc-MIR1450-p3_2ss19AG21TC	CGGTCAGGTTACACAAGCGAC	down	-2.27	0.006 95	是
mtr-miR171g_R+1	CGAGCCGAATCAATATCACTCC	down	-2.25	0.008 97	否
ptc-MIR169ae-p3_1ss20GA	TGGGCAAGCACCTTGGCTAAC	down	-1.55	0.009 87	否
mtr-miR166c_2ss1TG20TC	GCGGACCAGGCTTCATTCCCC	down	-1.30	0.003 29	否
ptc-MIR6438b-p5_1ss11AG	TCGACTGAAAAGTGAAAAGCTAT	down	-0.96	0.003 68	否
PC-5p-166_26156	TAGCCAAGAGCGACTTGCCCA	down	-0.76	0.007 70	否
ptc-MIR396d-p3	CTCAAGAAAGCCGTGGGAGA	down	-0.54	0.002 63	否
ptc-miR166n_L+2R-2	TCTCGGACCAGGCTTCATTCC	down	-0.53	0.006 92	否
ptc-miR1447_1ss21TC	CAGAATTGCAGTGCCTTGATC	up	0.43	0.004 66	否
ptc-miR476b_2ss8TC17CT	TAGTAATCCTTCTTTGTAAAA	up	0.60	0.002 85	否
ptc-MIR1447-p5_1ss6GT	AATCATGGCACTGCAATTCTA	up	0.68	0.005 60	否
ptc-miR319e_R+1	TTGGACTGAAGGGAGCTCCTT	up	1.00	0.001 08	否
vvi-miR172d_L-2R+1	AGAATCTTGATGATGCTGCATT	up	1.05	0.000 50	否
ptc-miR530a_R+1	TGCATTTGCACCTGCACCTTA	up	1.65	0.005 57	否
ptc-miR2111a	TAATCTGCATCCTGAGGTTTG	up	1.67	0.006 39	否
PC-3p-42422_177	TTTATGCGTTTTTGCCCCCTCG	up	1.95	0.003 47	否
ptc-miR6478_R+2_2ss5CT21GA	CCGATCTTAGCTCAGTTGGTAGA	up	2.11	0.008 94	是
ptc-MIR2111a-p3	GTCCTTGGGTTGCAGATTACC	up	2.58	0.001 48	是
ptc-MIR2111b-p3	GTCCTTGGGTTGCAGATTACC	up	2.58	0.001 48	是
vvi-MIR399d-p3_1ss13GA	TCTGCCAAAGGAAATTTGCTC	up	4.33	0.000 15	是
gma-miR166m_L+1_1ss5AC	GCGGCCAGGCTTCATTCCCC	down	-inf	0.003 18	否
PC-3p-82747_59	CCGATCATTATTGGTGACCTT	down	-inf	0.004 57	否
ptc-miR171k_1ss12CT	GGATTGAGCCGTGCCAATATC	down	-inf	0.001 50	否
ptc-MIR319b-p5_1ss4TC	TAGCTACCGACTCATTCATCCA	down	-inf	0.004 30	否

育过程中发挥重要功能(表5)。

## 2.6 不同氮形态处理下灰杨根尖 miRNAs-靶基因调控网络

为了研究不同氮形态处理下,杨树根尖差异表

达 miRNAs 与靶基因调控网络,利用上述结果进行联合分析。表6表明:有23个差异表达靶基因( $\log_2(\text{FC}) \geq 1$  或  $\leq -1$ ,  $P < 0.05$ )隶属于5个 miRNA 家族和一个新的 miRNA ( $P < 0.05$ )被鉴定,且

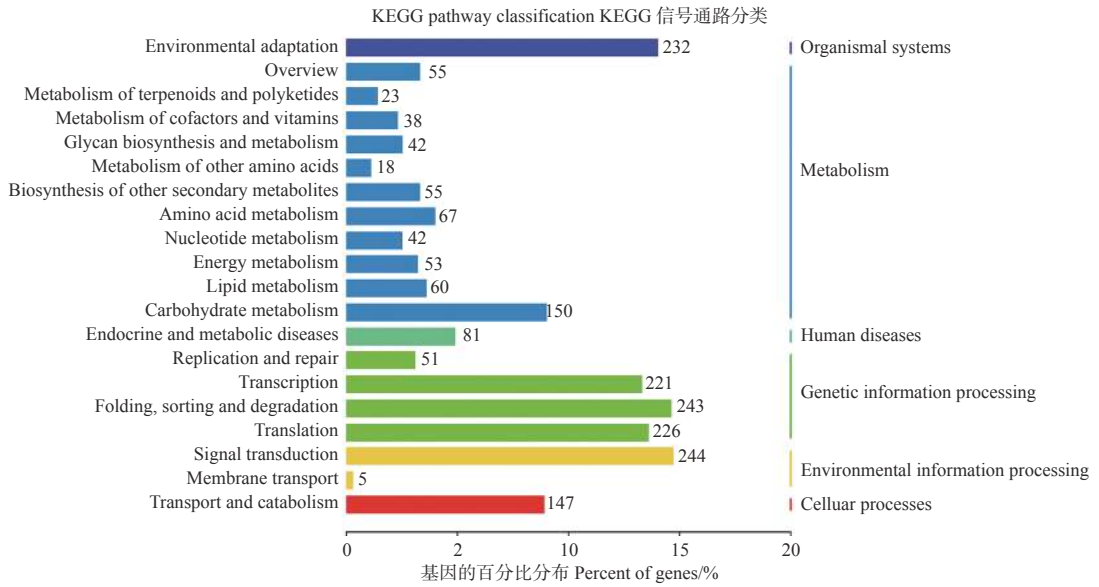


图4 KEGG 通路分析鉴定差异表达靶基因

Fig. 4 KEGG pathway analysis of significantly differentially expressed target genes

miRNA-靶基因呈现负相关调控关系, 表明这些靶基因可能是通过 miRNAs 转录抑制作用而被降解。

通过 RT-qPCR 实验验证了其中 7 个 miRNA-靶基因的表达模式, 结果显示: 差异表达 miRNAs 及其靶基因 RT-qPCR 分析与高通量测序产生的表达模式相似, 且表达模式呈负相关关系 (图 5)。

### 3 讨论

研究表明, 基因的表达受 miRNAs 调节, 不同氮形态可能导致 miRNAs 及其调控的靶基因差异表达, 从而影响植物根尖生长和发育<sup>[24]</sup>。本研究利用高通量测序平台研究不同氮形态处理下, 杨树根尖差异 miRNAs 和靶基因的表达模式。

在不同氮形态处理 10 d 后, 收获杨树根尖 40 mm 区段材料, 经过小 RNA 高通量测序分析, 获得 96 个显著差异表达 miRNAs, 其中, vvi-MIR399d-p3\_1ss13GA 上调表达倍数最高。前人研究表明, miR399 参与调控水稻多种营养饥饿反应<sup>[25]</sup>。在本研究中, miR399 靶基因为泛素化连接酶, 且与 miR399 呈负相关关系。有研究证明, 泛素分子主要通过泛素活化酶、泛素结合酶和泛素化连接酶将靶蛋白泛素化, 泛素化的蛋白最后被 26S 蛋白酶体识别和降解<sup>[26]</sup>, 该过程对植物营养缺乏等非生物胁迫发挥着重要作用<sup>[27]</sup>。因此, 可以推测 miR399 及其靶基因泛素化连接酶在不同氮形态胁迫响应中发挥着重要的调控作用。在本试验条件下, 部分差异

表达 miRNAs 与杨树根尖生长发育相关, 这与在水稻中的研究结果相似<sup>[15]</sup>。如 miR171 家族成员, 其靶基因之一是 *DELLA protein RHT-1*。DELLA 蛋白家族是 GA 信号途径中的负调控因子, 可以抑制 GA 途径的基因表达从而抑制植物生长<sup>[28]</sup>。另有研究表明, *DELLA-GRF4* 介导植物生长与氮代谢的协同调控机制, *DELLA* 的积累不仅导致水稻生长矮化, 而且降低了氮素利用效率<sup>[23]</sup>。在本研究中, 相比较于硝态氮处理, 铵态氮处理诱导 miR171 靶基因 *DELLA* 表达, 从而导致杨树根尖发育受到抑制, 根长变短。该研究说明杨树根尖部分差异表达 miRNAs 及其靶基因有通过对不同氮形态处理的响应而改变其根尖形态结构的能力。

对差异靶基因 KEGG 通路分析表明, 一些靶基因富集参与氮代谢途径, 如 *NADH-dependent glutamate synthase family protein* 和 *nitrate transmembrane transporter (NRT1.1)*。*NADH-dependent glutamate synthase family protein* 酶作为铵态氮吸收同化过程中的关键酶对植物幼苗期根系的初级铵同化很重要<sup>[29]</sup>。另有研究表明, 在水稻 *NADH-gogat1* 突变体中, 相比较于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 硝态氮处理, 1 mmol·L<sup>-1</sup> 铵态氮处理抑制其根系的生长<sup>[29]</sup>, 该研究结果与本研究结果相一致。相比较于硝态氮处理, 铵态氮处理抑制靶基因 *NADH-dependent glutamate synthase family protein* 表达, 从而导致杨树根尖发育受到抑制, 这表明 *NADH-dependent*

表5 灰杨根尖氮代谢以及生长发育相关差异表达靶基因

Table 5 Significantly differentially expressed target genes related to nitrogen metabolism and growth and development of *P. × canescens* root tips

miRNAs ID miRNAs ID	靶基因ID Targets ID	功能注释 Functional annotation
ptc-MIR166i-p5	Potri.015G017500.4	<i>glutamate synthase (NADH)</i>
ptc-MIR6462a-p5_1ss14TC	Potri.005G079200.1	<i>aminotransferase class I and II family protein</i>
gma-miR6300_1ss5TG	Potri.001G300900.1	<i>embryo sac development arrest 9</i>
gma-miR6300_R+1_1ss5TG	Potri.001G300900.1	<i>embryo sac development arrest 9</i>
gma-miR6300_1ss5TG	Potri.001G300900.2	<i>embryo sac development arrest 9</i>
gma-miR6300_R+1_1ss5TG	Potri.001G300900.2	<i>embryo sac development arrest 9</i>
gra-MIR8723b-p3_2ss6TC21TC	Potri.003G111500.1	<i>nitrate transmembrane transporter, NRT1.1</i>
gra-MIR8723b-p3_2ss6TC21TC	Potri.003G111500.2	<i>nitrate transmembrane transporter, NRT1.1</i>
gra-MIR8723b-p3_2ss6TC21TC	Potri.003G111500.3	<i>nitrate transmembrane transporter, NRT1.1</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.017G086200.1	<i>NAC domain-containing protein 77 (NAC077)</i>
ptc-miR164a	Potri.017G086200.1	<i>NAC domain-containing protein 77 (NAC077)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.017G086200.1	<i>NAC domain-containing protein 77 (NAC077)</i>
ptc-MIR7813-p5_2ss13AG20CT	Potri.017G016700.1	<i>NAC domain-containing protein 73 (NAC073)</i>
cca-miR164	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164a_1ss17AT	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164b_R+3	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164a	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164f	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.007G065400.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
cca-miR164	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164a_1ss17AT	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164b_R+3	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164a	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164f	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.007G065400.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
cca-miR164	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164a_1ss17AT	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164b_R+3	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164a	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164f	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.005G098200.3	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
cca-miR164	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164a_1ss17AT	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164b_R+3	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164a	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164f	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.005G098200.2	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
cca-miR164	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164a_1ss17AT	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mdm-miR164b_R+3	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
mtr-miR164a_1ss21AG	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164a	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
ptc-miR164f	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>
vvi-miR164a_R+1	Potri.005G098200.1	<i>NAC domain-containing protein 1 (NAC1)</i>



表6 不同氮形态处理条件下灰杨根尖差异表达 miRNA-靶基因

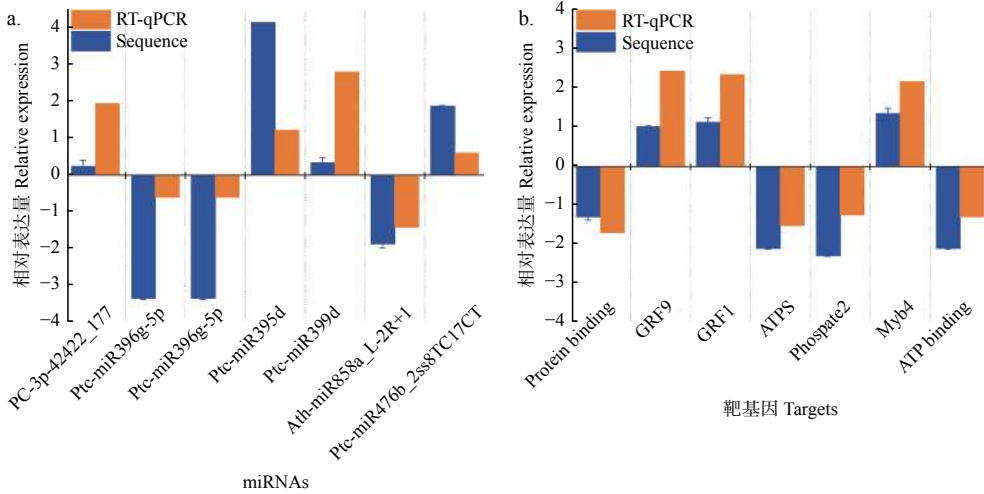
Table 6 Significantly differentially expressed miRNAs-target pairs in root tips of *P. × canescens* under different nitrogen forms treatments

miRNAs ID miRNAs ID	上调/下调 Up/down	靶基因ID Targets ID	log <sub>2</sub> (FC) log <sub>2</sub> (FC)	靶基因注释信息 Target Functional annotation
PC-3p-42422_177	up	Potri.003G152300.2	-3.177 77	NA
PC-3p-42422_177	up	Potri.003G152000.1	-3.177 77	NA
PC-3p-42422_177	up	Potri.003G152300.1	-3.177 77	NA
ptc-miR396g-5p	down	Potri.014G012800.1	2.346 49	growth-regulating factor 1 (GRF1)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.013G077500.1	inf	growth-regulating factor 5 (GRF5)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.001G132600.1	1.613 36	growth-regulating factor 2 (GRF2)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.014G071800.1	2.436 61	growth-regulating factor 9 (GRF9)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.003G100800.4	1.001 54	growth-regulating factor 2 (GRF2)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.003G100800.3	1.001 54	growth-regulating factor 2 (GRF2)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.003G100800.1	1.00154	growth-regulating factor 2 (GRF2)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.003G100800.2	1.001 54	growth-regulating factor 2 (GRF2)
ptc-miR396g-5p	down	Potri.007G007100.1	1.463 15	growth-regulating factor 1 (GRF1)
ptc-miR395b	up	Potri.008G159000.3	-1.159 23	ATP sulfurylase 1
ptc-miR395b	up	Potri.010G081200.2	-1.727 46	Pseudouridine synthase (ATPS)
ptc-miR395b	up	Potri.010G081200.1	-1.727 46	Pseudouridine synthase (ATPS)
ptc-miR395b	up	Potri.010G081200.3	-1.727 46	Pseudouridine synthase (ATPS)
ptc-miR395b	up	Potri.008G159000.2	-1.159 23	ATP sulfurylase 1
ptc-miR395b	up	Potri.008G159000.1	-1.159 23	ATP sulfurylase 1
ptc-miR399d	up	Potri.011G052600.1	-1.157 53	phosphate 2
ptc-miR399b	up	Potri.011G052600.1	-1.157 53	phosphate 2
ath-miR858a_L-2R+1	down	Potri.006G221800.1	2.165 71	Duplicated homeodomain-like superfamily protein (myb4)
ath-miR858a_L-2R+1	down	Potri.006G221800.2	2.165 71	Duplicated homeodomain-like superfamily protein (myb4)
ath-miR858a_L-2R+1	down	Potri.006G221800.3	2.165 71	Duplicated homeodomain-like superfamily protein (myb4)
ptc-miR476b_2ss8TC17CT	up	Potri.006G242500.1	-1.285 67	ATP binding; nucleic acid binding; helicases

glutamate synthase family protein 可能在植物根尖响应不同氮形态时发挥重要的作用。*NRT1.1* 作为硝态氮转运体对硝态氮的反应范围广泛, 从初始硝酸盐反应到长期发育变化, 且对侧根发育的影响发挥着重大作用, 即 *NRT1.1* 在低浓度硝态氮条件下抑制侧根生长, 而在高浓度硝态氮条件下促进植物侧根生长<sup>[30]</sup>, 该结论与本文研究结果一致。在本研究中, 相比较于硝态氮处理, 铵态氮处理下靶基因 *NRT1.1* 上调表达, 抑制了杨树侧根的伸长生长。另外, 对灰杨根尖氮代谢以及生长发育相关差异表达靶基因进行 MapMan 分析表明, *NAC* 基因家族出现频率最多。在拟南芥中, *NAC4* 基因作为 *protein auxin signaling F-BOX 3 (AFB3)* 的下游基因, 参与硝态氮响应, 从而影响根系形态结构<sup>[31]</sup>。

在小麦中, *TaNAC2-5A* 可直接结合硝酸盐转运体和谷氨酰胺合成酶基因的启动子区域, 过表达 *TaNAC2-5A* 可促进小麦根系生长和硝酸盐流入<sup>[32]</sup>。在本研究中, 相比较于铵态氮处理, 硝态氮处理中 *NAC1* 基因高表达, 从而促进根生长, 这一结论与前人的研究结果相一致。

在联合分析中, 共发现 24 对 miRNA-靶基因呈负相关关系, 其中, miR396-GRF 是联合分析中出现最多的一组关系对。*GRF4* 作为 miR396 的靶基因能够驱动水稻根对铵态氮的吸收<sup>[23]</sup>, 同时 *GRF4* 能够驱动硝态氮转运体的转录水平, 例如 *NRT1.1B* 和 *NRT2.3a*、*GRF4* 还能够驱动硝态氮同化酶基因 *nitrate reductase 1 (NIA1)*、*NIA3* 和 *nitrite reductase 1 (NiR1)* 的合成从而去调节氮代谢, 且在



注: a: RT-qPCR 证实了 miRNAs 在不同氮形态处理下测序与定量结果的一致性。b: RT-qPCR 证实了靶基因在不同氮形态处理下测序与定量结果的一致性。

Notes: a: RT-qPCR confirmed the consistency of the sequencing and quantitative results of miRNAs under different nitrogen forms treatments. b: RT-qPCR confirmed the consistency of the sequencing and quantitative results of target genes under different nitrogen forms treatments.

图5 不同氮形态处理下 miRNAs-靶基因对差异表达分析

Fig. 5 Validation of significantly differentially expressed miRNAs and their targets under different nitrogen forms treatments by sRNA-seq and RT-qPCR

水稻中, *GRF4* 突变抑制植物生长<sup>[23]</sup>。在本研究中, 相比较于硝态氮处理, 在铵态氮处理中 miR396 下调表达, 其靶基因 *GRF1/2/5/9* 均上调表达, 从而促进杨树根生长, 这一结论与前人的研究结果相一致。该结果说明 miR396-*GRF* 在不同氮形态胁迫响应中发挥着重要的调控作用。另外, 表达差异最显著的靶基因为新 miRNAPC-3p-42422\_177 的 3 个靶基因, 但其功能未知, 有待进一步研究证实。

## 4 结论

本研究从 2 种不同氮形态处理杨树根尖 miRNAs 文库中鉴定出 523 个已知 miRNAs 和 42 个新 miRNAs, 其中, 有 96 个 miRNAs 显著差异表达。与硝态氮处理相比, 铵态氮处理下有 44 个 miRNAs 上调表达, 52 个下调表达, 其中, miR396-*GRF* 模块引起笔者的关注。研究表明, miR396-*GRF* 模块可能通过响应不同氮形态调控杨树根系形态构型。该研究不仅可以为我国转基因杨树研究储备基因资源信息, 还可以加快氮吸收能力强的杨树优质速生良种的培育。

## 参考文献:

- [1] 国家林业局森林资源管理司, 全国森林资源统计-第七次全国森林资源清查[R]. 北京: 国家林业局, 2010, 37(2): 1-7.
- [2] Castro-Rodríguez V, García-Gutiérrez A, Canales J, et al. Poplar trees

for phytoremediation of high levels of nitrate and applications in bioenergy[J]. Plant Biotechnology, 2016, 14(1): 299-312.

- [3] Rennenberg H, Wildhagen H, Ehlting B. Nitrogen nutrition of poplar trees[J]. Plant Biol (Stuttg), 2010, 12(2): 275-291.
- [4] Lu Y, Deng S, Li Z, et al. Competing endogenous RNA networks underlying anatomical and physiological characteristics of poplar wood in acclimation to low nitrogen availability[J]. Plant Cell Physiology, 2019, 60(11): 2478-2495.
- [5] Wei H, Yordanov Y S, Georgieva T, et al. Nitrogen deprivation promotes *Populus* root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks[J]. New Phytology, 2013, 200(2): 483-497.
- [6] O'Brien J A, Vega A, Bouguyon E, et al. Nitrate transport, sensing, and responses in plants[J]. Molecular Plant, 2016, 9(6): 837-856.
- [7] Zhou J, Fan Y, Chen H. Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiles in the spinal cord of rats using RNA sequencing during the progression of neuropathic pain in an SNI model[J]. RNA Biology, 2017, 14(12): 1810-1826.
- [8] Liu C, Li C, Deng Z, et al. Long non-coding RNA BC168687 is involved in TRPV1-mediated diabetic neuropathic pain in rats[J]. Neuroscience, 2018, 374: 214-222.
- [9] Peng H, Zou L, Xie J, et al. lncRNA NONRATT021972 siRNA decreases diabetic neuropathic pain mediated by the P2X3 receptor in dorsal root ganglia[J]. Molecular Neurobiol, 2017, 54(1): 511-523.
- [10] Campa C, Diouf D, Ndoye I, et al. Differences in nitrogen metabolism of *Faidherbia albida* and other N-2-fixing tropical woody acacias reflect habitat water availability[J]. New Phytologist, 2000, 147: 571-578.

- [11] Barzegari M, Sepaskhah A R, Ahmadi S H. Irrigation and nitrogen managements affect nitrogen leaching and root yield of sugar beet[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2017, 108(2): 211-230.
- [12] Gunn K M, Baule W J, Frankenberger J R, *et al.* Modeled climate change impacts on subirrigated maize relative yield in northwest Ohio[J]. *Agricultural Water Management*, 2018, 206: 56-66.
- [13] Gaudin A C, McClymont S A, Holmes B M, *et al.* Novel temporal, fine-scale and growth variation phenotypes in roots of adult-stage maize (*Zea mays* L.) in response to low nitrogen stress[J]. *Plant Cell Environment*, 2011, 34(12): 2122-2137.
- [14] Zhang H, Rong H, Pilbeam D. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(9): 2329-2338.
- [15] Li H, Hu B, Wang W, *et al.* Identification of microRNAs in rice root in response to nitrate and ammonium[J]. *J Genet Genomics*, 2016, 43(11): 651-661.
- [16] Zhou J, Lu Y, Shi W, *et al.* Physiological characteristics and RNA sequencing in two root zones with contrasting nitrate assimilation of *Populus × canescens*[J]. *Tree Physiology*, 2020, 40(10): 1392-1404.
- [17] Tang G, Reinhart B J, Bartel D P, *et al.* A biochemical framework for RNA silencing in plants[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(1): 49-63.
- [18] Ren Y, Sun F, Hou J, *et al.* Differential profiling analysis of miRNAs reveals a regulatory role in low N stress response of *Populus*[J]. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(1): 93-105.
- [19] Lu S, Sun Y, Shi R, *et al.* Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2005, 17(8): 2186-2203.
- [20] Gifford M L, Dean A, Gutierrez R A, *et al.* Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(2): 803-808.
- [21] Vidal E A, Araus V, Lu C, *et al.* Nitrate-responsive miR393/*AFB3* regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(9): 4477-4482.
- [22] Gutierrez R A. Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition[J]. *Science*, 2012, 336(6089): 1673-1675.
- [23] Li S, Tian Y, Wu K, *et al.* Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture[J]. *Nature*, 2018, 560(7720): 595-600.
- [24] Guo Q, Love J, Roche J, *et al.* A RootNav analysis of morphological changes in *Brassica napus* L. roots in response to different nitrogen forms[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 83(1): 83-92.
- [25] Hu B, Wang W, Deng K, *et al.* MicroRNA399 is involved in multiple nutrient starvation responses in rice[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 188.
- [26] 许传俊, 李玲. 泛素\_26S蛋白酶体途径与植物的生长发育[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(3): 635-643.
- [27] 朱美娇, 张海玲, 徐香玲, 等. 泛素\_26S蛋白酶体途径调节非生物胁迫的研究进展[J]. *北方园艺*, 2015(3): 188-192.
- [28] Harberd N P, Belfield E, Yasumura Y. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(5): 1328-1339.
- [29] Tamura W, Hidaka Y, Tabuchi M, *et al.* Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants[J]. *Amino Acids*, 2010, 39(4): 1003-1012.
- [30] Maghiaoui A, Gojon A, Bach L. *NRT1.1*-centered nitrate signaling in plants[J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(20): 6226-6237.
- [31] Zhao M, Ding H, Zhu J, *et al.* Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*[J]. *New Phytol*, 2011, 190(4): 906-915.
- [32] He X, Qu B, Li W, *et al.* The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 1991-2005.

# miRNAs Analysis of Poplar Root Tips Treated with Nitrate- or Ammonium-Nitrogen

*KAN Dong-xu<sup>1,2</sup>, LU Yan<sup>1</sup>, WU Jiang-ting<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>, SHI Wen-guang<sup>1</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>*

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Silviculture of the State Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. State key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

**Abstract:** [Objective] To screen the differentially expressed miRNAs from root tips of poplar through small RNAs high-throughput sequencing technology, to study the regulation mechanism of miRNAs and their target genes related to nitrate or ammonium responses and try to identify and explain the morphological characteristics of poplar root tips growth and development. [Method] Using root tips of poplar as the research object, the high-throughput sequencing technology for small RNA library construction was applied to reveal the genetic differences of nitrogen forms in miRNA level, and to identify the differentially expressed miRNAs. Meanwhile, degradation sequencing technology was used to identify the miRNA target genes, and the functional annotation, clustering and metabolic pathway enrichment of the differentially expressed target genes were analyzed. Through conjoint analysis, the regulation network of miRNA-target pairs in the root tips of poplar was clarified under different nitrogen forms treatments. [Result] 523 known and 42 novel miRNAs were identified from miRNA libraries. A total of 96 miRNAs with significantly different expression were identified. Under ammonium treatment, 44 miRNAs were upregulated and 52 downregulated. Among them, the upregulation of vvi-MIR399d-p3\_1ss13GA and the downregulation of novel miRNA PC-5p-35885\_222 were the most significant. The KEGG pathway analysis of differentially expressed target genes of miRNAs in the libraries showed that some significantly different expression target genes were involved in nitrogen response pathway. Real time fluorescence quantitative PCR confirmed 7 randomly selected miRNA-target pairs, and the results were consistent with the sequencing data. [Conclusion] miRNAs and their target genes may play important roles in nitrogen response of poplar root tips after treatments with different forms of nitrogen, thus the root length under nitrate-nitrogen treatment is almost twice that under ammonium-nitrogen treatment.

**Keywords:** nitrate-nitrogen; ammonium-nitrogen; miRNA; mRNA; poplar; root

(责任编辑: 张 研)