

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00227

植物逆境 miRNA 研究进展

沈亚欧, 林海建, 张志明, 高世斌, 潘光堂

四川农业大学玉米研究所, 教育部作物基因资源与遗传改良重点实验室, 雅安 625014

摘要: 包括生物和非生物在内的多种逆境胁迫是植物正常生长和作物产量提高的重要限制性因素。植物在长期的进化过程中, 通过诱导表达某些抵御或防卫途径的关键基因来实现对胁迫的响应。研究表明, 逆境胁迫不仅会诱导植物蛋白质编码基因的表达, 也会诱导一些非蛋白质编码基因的表达, 这类非蛋白质编码基因的表达产物在植物的生长、发育和应对逆境胁迫等过程中起到重要的调控作用。miRNA(小分子 RNA)就是这类非蛋白质编码基因产物中的重要类群, 研究发现, 多种逆境均会诱导 miRNA 的产生, 其作用是通过引导目的基因 mRNA 的降解和阻止翻译过程来调控靶基因, 最终通过形态或生理上的变化达到对逆境的适应。文章主要对植物逆境胁迫下 miRNA 的研究, 特别是逆境胁迫诱导 miRNA 的产生、靶基因调控以及 miRNA 在植物适应逆境胁迫过程中的作用进行了综述, 同时, 文章还对在逆境胁迫下植物 miRNA 的研究方法进行了初步的探讨。

关键词: miRNA; 逆境胁迫; 靶基因; 基因调控

Advances in study of plant miRNAs under stressed environmental conditions

SHEN Ya-Ou, LIN Hai-Jian, ZHANG Zhi-Ming, GAO Shi-Bin, PAN Guang-Tang

Institute of Maize Research, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Ya'an 625014, China

Abstract: Biotic and abiotic stresses influence plant growth and cause great loss to crop yield. In the long course of evolution, plants have developed intricate biological mechanism to resist stressed conditions. Under various stressed conditions, not only the protein-coding genes, but also the non-protein-coding genes were induced for response. More and more researches showed that the transcripts of these non-protein-coding genes played important role in regulation of gene expression. miRNA is one of the groups in these no-coding regulatory small RNAs. Recent findings showed that in order to resist the biotic and abiotic stresses, expression of microRNA (miRNA) genes will be induced and their transcripts (miRNAs) can regulate gene expression by guiding target mRNA cleavage or translation inhibition. This paper focused on the advances of plant miRNAs research in stressed conditions, especially induced expression of miRNA and target gene regulation and its role on adaptation under stressed conditions. Then, the methods of miRNA researches in stressed environments are discussed.

Keywords: microRNA; biotic/abiotic stress; target gene; gene regulation

收稿日期: 2008-08-23; 修回日期: 2008-12-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2007AA10Z172)和国家自然科学基金项目(编号: 30700506 资助)

作者简介: 沈亚欧(1979-), 女, 博士, 研究方向: 玉米逆境分子生物学。E-mail: shenyaou@yahoo.com.cn

林海建(1981-), 男, 博士, 研究方向: 玉米逆境分子生物学与遗传育种。E-mail: Linhj521@yahoo.com.cn

沈亚欧, 林海建同为第一作者。

通讯作者: 潘光堂(1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 玉米生物技术与遗传育种。Tel: 0835-2882714; E-mail: pangt1956@yahoo.com.cn

逆境胁迫是作物生长和产量提高的重要限制性因素之一,大量研究正试图揭示这一复杂的生物学机制。miRNA作为小分子RNA(Small RNA)中重要的一个类群,同时作为新的基因表达调控因子越来越引起人们的关注^[1,2]。miRNA是具有约 21 个核苷酸长度的内源RNA,最早在线虫(*Caenorhabditis elegans* L.)中被发现^[3,4],后来通过克隆和生物信息学的方法在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[5]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[6]、玉米(*Zea mays* L.)^[7]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[8]和苔藓(*Moss* L.)^[9]等植物中也发现了不同数量和类型的miRNA。对拟南芥、水稻等模式植物miRNA的研究揭示了miRNA在植物的生长、发育、维持基因组完整等生理过程中的重要作用^[10]。最近的研究表明,植物在多种逆境胁迫下存在着miRNA的诱导表达,并证实了某些miRNA在植物感受逆境胁迫而做出适应性调整的过程中发挥着重要的作用^[11-13]。随着研究的深入,miRNA将为我们阐明植物耐胁迫机理和提高植物耐胁迫能力提供重要的参考。

1 植物 miRNA 的产生、成熟及目标基因的识别

与动物miRNA 来源于内含子区域不同的是,植物miRNA是由分布于整个基因组中独立的MIR基因编码产生的,MIR基因转录产生一个或多个较长的初级转录产物,该产物将进一步形成一个特定的二级茎环(Stem-loop)结构,再由类似于RNAase 的酶(如 Dicer)^[14] 通过两步酶切加工,并在HYL1(HYPONASTICLEAVES1)、HEN1(HUAENHANCER1)、HST(HASTY)^[15]等蛋白的作用下,形成成熟的miRNA。成熟后的单链miRNA将与Argonaute (AGO)蛋白作用形成一个RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)并与目标mRNA结合而发挥作用^[16,17]。miRNA的成熟经过了两次连续的加工过程,因此miRNA的表达调控可以在多个水平上进行^[18,19]。研究表明,miRNA在动物和植物中对靶基因的识别方式是不同的,在动物细胞中,大部分miRNA序列与它们的靶基因mRNA序列并不完全互补,它们一般是通过与一个或多个靶基因mRNA的 3'非编码区(3'UTR)结合,阻止翻译过程的进行,从而起到调控基因表达的作用;在植

物细胞中,miRNA与靶基因的mRNA序列完全互补,通过类似于RNA干涉(RNAi)的机制导致靶基因mRNA降解^[15]。

2 miRNA 与植物逆境胁迫

逆境胁迫会诱导植物相关基因的表达,其结果将最终引起某些物质的积累和代谢途径发生改变,从而使植物做出相应的适应性调整^[20,21]。许多基因的表达受到诸如干旱、水分、温度、养分及病菌感染等逆境胁迫的调控,其中包括转录水平、转录后水平和翻译水平上的调控,而转录后水平的调控,特别是转录因子直接与保守的顺式作用启动子元件结合来调控靶基因,这种调控方式在逆境胁迫下基因表达调控中较为普遍^[21]。虽然目前对逆境胁迫下转录后水平的调控机制尚不明确^[22],但已有的研究表明,miRNA在植物逆境胁迫下的调控机制可能属于这一类型^[13]。养分、干旱和病毒侵染等逆境胁迫均能调控miRNAs的表达(表 1),通过对靶基因预测和功能分析后发现,某些胁迫诱导的miRNA还直接参与了植物逆境胁迫下的适应性反应^[23-25]。对逆境胁迫下植物miRNA的产生、变化和靶基因的识别为miRNA的研究提供了重要的思路。阐明这种由miRNA介导下的调控网络有助于更好地理解植物耐胁迫机理,进而通过分子生物学方法和基因工程手段来提高作物的耐胁迫能力,以便更好地服务于农业生产。

2.1 miRNA 与植物养分胁迫

2.1.1 miRNA 与低磷胁迫

磷是植物三大营养元素之一,对植物的生长发育具有重要的作用。土壤有效磷缺乏是一个世界性问题,已成为许多地区作物生长的限制性因素^[26]。在长期的进化过程中,植物自身也发展了一套适应性变化,如改变根系形态结构以增加与土壤的接触面积,根系分泌有机酸和酸性磷酸酶分解根际难溶性磷来增加对磷的吸收,提高植物体内磷的循环利用等^[27,28]。这些适应性变化与低磷胁迫下某些特定基因的表达和调控密切相关,虽然目前对低磷胁迫诱导基因表达和调控做了大量研究,但其详细的调控机制仍不明确^[29]。对拟南芥miRNA399 的研究发现,miRNA399 在拟南芥感受低磷胁迫时保持体内

表 1 部分与植物逆境胁迫相关的 miRNA 及其已证实或可能的靶基因

miRNA 名称	处理条件	调控方式	已证实或推测的靶基因	参考文献
miRNA399	低磷胁迫	正调控	Pi Transporter , E2-泛素结合蛋(UBC24)	[12, 23, 31]
miRNA395	低硫胁迫	正调控	AST68, APS1, APS3, APS4	[13]
miRNA159	真菌浸染	未知	MYB 转录因子、TCP 转录因子	[50, 77]
miRNA393	病菌浸染、低温、干旱、高盐和 ABA 胁迫	正调控	生长素受体 (TIR1)、F-box 蛋白(AFB1、AFB2、AFB3)	[11, 24]
miRNAs	UV-B 辐射	正调控	生长素相关因子(ARF)	[64]
miRNAs	力学胁迫	正调控, 正或负调控	防御及细胞壁形成过程中的相关基因	[66]
miRNA398	由强光、重金属离子等造成的氧化胁迫; 低铜胁迫	负调控	铜锌超氧化物歧化酶 1、2, 细胞色素 <i>c</i> 氧化酶 V 亚基	[25, 39]
miRNA319c	低温	正调控	MYB 转录因子、TCP 转录因子	[11, 15]
miRNA389	低温、干旱、高盐和 ABA 胁迫	负调控	未知蛋白	[11]

磷的稳定中具有重要的作用^[30]。拟南芥基因组编码 6 个 *MIR399* 基因^[11], 均受低磷胁迫的诱导^[29]。研究发现, 与 miRNA399 结合的靶基因属于无机磷转运子(*Pi transporter*)^[13]和泛素结合酶(*UBC24*)这两个基因家族, 它们都在保持植物体内磷的稳定中发挥作用。在低磷胁迫下, 植物体内 miRNA399 的表达水平急剧上升, 当恢复供磷时又急剧下降。miRNA399 与 *UBC* mRNA 水平在正常和低磷胁迫时均存在着一个倒置的关系^[23, 31], 而低磷胁迫下, *UBC* 的下调表达对主根的延长、磷高亲和力转运子的表达(如 *AtPT1*)具有重要的作用, 这些对保持植物体内磷的稳定十分重要^[13]。*UBC* 突变体(*pho2*)被认为具有在茎和叶中积累磷的功能, 而对 *pho2* 的克隆分析后发现, *pho2* 正是 miRNA399 指导下的 *UBC24* 的靶基因^[29, 31], 表明 *pho2* 和 *UBC24* 的作用均受 miRNA399 的调控。目前对 miRNA399 调控 *pho2* 和 *UBC24* 的机制展开了深入研究, 发现可能存在着一个泛素或蛋白体参与的负调控途径, 如在供磷正常的情况下, *pho2* 和 *UBC24* 表达量增加的同时, miRNA399 的表达却受到抑制, 从而进一步抑制磷转运子和控制激素分泌等相关基因的表达, 降低植株根系的生长和对磷的吸收, 使其免于磷中毒^[29, 32], 而低磷胁迫下, 在诱导 miRNA399 表达的同时却抑制了 *pho2* 和 *UBC24* 的表达, 从而加速了磷转运子基因的表达以及通过根系结构的改变来增大对磷的吸收。研究表明, 低磷胁迫同时诱导油菜和西葫芦韧皮液中 miRNA399 表达, 但根系中并不存在 miRNA399 的初级转录产物, 由此推测存在着一个由茎叶向根系转运的长距

离运输过程, 由此来保证根系细胞内磷素水平的稳定^[33]。

2.1.2 miRNA 与低硫胁迫

硫是植物生长发育过程中具有重要作用的元素之一, 植物主要以无机态的形式对其吸收和利用^[34]。植物在低硫胁迫下会通过一些生理上的改变来维持体内硫素的平衡。通过对拟南芥 miRNA395 的研究揭示了 miRNA 在维持拟南芥硫素平衡中的重要作用^[30]。研究表明, miRNA395 可能在拟南芥基因组中的两个基因簇的 6 个基因位点发挥作用, 其中一类是催化硫吸收的 ATP 硫化酶基因, 如 *APS1*、*APS3* 和 *APS4* 等^[35]。另一个是 *AsT68*, 一个低亲和力硫转运子, 其主要作用是将硫由根系转运至茎叶^[36]。已有研究结果表明, miRNA395 受低硫胁迫诱导的同时, *APS1* 的转录水平下降, 当供硫正常时, *APS1* 的转录水平增加, miRNA395 表达完全受到抑制^[13], 表明可能存在着某些负调控途径, 但详细的调控机制还有待进一步研究。

2.1.3 miRNA 与铜素营养

铜是某些结构蛋白和催化蛋白的重要组成部分, 对植物的生长发育具有重要的作用^[37]。质体蓝素、Cu/Zn 超氧化物歧化酶(SOD)和细胞色素 *c* 是植物细胞中主要的含铜化合物。Cu/Zn 超氧化物歧化酶参与植物抗氧化途径(见 2.5), 催化活性氧转化为 H_2O_2 ^[38]。Cu/Zn SOD、Mn SOD 和 Fe SOD 是目前植物中已知的 3 种超氧化物歧化酶, 研究发现, 在铜素缺乏的环境下, Cu/Zn SOD 的表达受到抑制, 其在

叶绿体中的作用被Fe SOD所代替,该过程被认为是植物自身应对铜素缺乏的适应性变化,而miRNA398在这个过程中发挥着重要的作用^[39]。在铜素缺乏的情况下,miRNA398介导了Cu/Zn SOD mRNA的降解过程。当介质中铜含量降低到一定程度时,该降解过程将会发生。在3种铜蛋白中,除质体蓝素外,Cu/Zn SOD和线粒体细胞色素c的一个亚基,COX5b-1均受miRNA398的调控^[39]。该研究表明了在铜素缺乏条件下miRNA398在维持植物正常生理过程中的重要作用。

2.2 miRNA与植物病害胁迫

RNA沉默是发生在植物(转录后基因沉默后共抑制)、动物(RNA干扰)和真菌(消除作用)等真核生物细胞中的一种对外源遗传因子(转座子、转基因或病毒)的一种特异和高效的降解机制^[40-42]。转录后基因沉默共抑制现象(Posttranscriptional gene silence co-suppression, PTGS)最初是在转花青素基因的矮牵牛中被发现^[43, 44],后来发现植物病毒也能诱发这种现象^[45],并提出了PTGS在植物抗病毒侵染的可能的生物学机制。随着研究的深入,研究人员发现这些在表面上看似不相关的现象,其实都是由同源的转基因、RNA病毒和双链RNA等诱导产生的一种特定序列的RNA降解机制,其作用表现在抵御病毒、转座子等外来核酸的入侵、识别并抑制外源基因表达,维持基因组的完整等方面^[46, 47]。细菌或病毒在侵染植物宿主的过程中均会诱导大量小分子RNA的产生,其中一部分被证实为miRNA^[48, 49]。其作用方式表现在植物在miRNA的指导下通过类似于RNA干涉的形式切割病毒RNA和病毒通过miRNA作用指导切割多种调控性靶基因来干扰宿主细胞的基因表达。

在正常情况下,miRNA能够调控某些抗病途径中的关键靶基因来抵御病菌的入侵,Lionel等^[24]的研究表明,鞭毛蛋白能提高拟南芥对紫丁香属假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的抗性,原因在于来源于鞭毛蛋白的多肽能诱导产生一个对生长素受体(TIR1、TIR2和TIR3) F-box mRNAs进行负调控的miRNA,而抑制生长素信号能抑制该菌的生长。同时,某些病毒也可以通过干扰宿主miRNA表达来应对植物的防御,AC4是非洲木薯花叶病毒(African

cassava mosaic virus)编码的蛋白,它能与拟南芥成熟的miRNA159结合并阻止其对正常目标mRNA的调控,从而干扰了转录后基因沉默共抑制过程,属于典型的PTGS抑制物^[50]。而某些植物病毒如烟草花叶病毒科(*Tobamoviridae*)和马铃薯Y病毒科(*Potyviridae* L.)能引起烟草相关miRNA积累水平的变化,其发病症状与这些miRNA的变化水平存在着一定的相关性。这一过程并不是抑制PTGS过程,而是直接作用于miRNA的表达水平,从而影响植物的抗病能力^[49]。

2.3 miRNA与UV-B辐射胁迫

光是植物整个生命循环过程中关键的因素之一,在植物的生长、发育和成熟的过程中起着重要的作用^[51, 52]。自然光中的紫外光分为UV-A、UV-B和UV-C,UV-A不能被臭氧层吸收,对植物也不构成伤害,是植物生长发育过程中重要的光信号;高能量的UV-C极易被臭氧层吸收,因此对地球生物圈不构成紫外辐射的威胁;而UV-B形式的紫外光有96%被臭氧层吸收,余下的4%能够达到地表生物圈并造成危害^[53]。随着诸如氯氟烃类物质对臭氧层破坏程度的加深,UV-B水平的上升将导致人类患皮肤癌几率的增加^[54]并对作物生长及产量造成极大的影响^[55]。由于植物需要光进行光合作用,因此也不可避免的受到UV-B的危害。UV-B辐射能引起植物形态、生理及分子水平的变化^[55, 56],如DNA的损伤而直接导致蛋白质合成的受阻^[54]。在长期的进化过程中,植物自身也发展了抵御UV-B辐射的保护和修复损伤机制,比如与紫外线吸收相关色素的积累和利用UV-A光子来修复由UV-B造成的DNA损伤^[57-59]。UV-B辐射还将造成活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产物的积累和诱导抗氧化途径的产生^[60, 61]。这些过程均存在着大量相关基因的诱导表达,但其详细的机制尚不明确,从目前的研究方向看,利用基因芯片从整个基因组水平上研究UV-B辐射诱导植物基因表达对于阐明其抗辐射机制具有重要的意义^[62, 63]。

UV-B辐射诱导miRNA基因表达来源于对模式植物拟南芥的研究,Zhou等^[64]利用miRNA基因芯片从拟南芥植株中筛选与UV-B辐射相关的miRNA,并提出新的生物信息学方法来验证得到的与UV-B

辐射有关的miRNA和它们在基因表达调控中的功能。该研究得到了 21 个miRNAs, 分别属于 11 个miRNA基因家族, 这些miRNA基因均受UV-B辐射的正调控。对这些miRNA的靶基因预测后发现, 这些与UV-B辐射有关的miRNA可能参与了与微管细胞的分化、微管的发育、分生组织的形成和侧根形成等生理过程中的生长素(Auxin)信号传导过程。但要阐明这些由miRNA介导的抗UV-B辐射的分子机制, 有待于进一步的研究。

2.4 miRNA 与植物机械(力学)胁迫

机械胁迫又称力学胁迫, 如树木枝干在风力或重力的作用下造成的弯曲等伤害。树木枝条在长期过度重力或风力的作用下, 能产生一种特殊的木化组织, 该组织能纠正下倾的枝条使其正常生长^[65], 这种正确的生长被认为是树木自身在抵御机械胁迫中产生的防御系统, 但对这种防御系统的形成机制并不十分明确。Lu等^[66]从机械胁迫 4 天的毛果杨(*Populus trichocarpa* L.)中分离得到了 22 个miRNAs, 分别属于 21 个miRNA基因家族。对其靶基因的预测后发现, 大部分miRNA靶向于与发育和胁迫防御相关, 特别是与细胞壁代谢合成有关的基因。研究表明, 木化茎中大多数克隆得到的miRNA的表达受到正向或负向调控, 并且与在拉升和挤压这两种力学胁迫下毛果杨适应性生长具有高度的一致性。Lu等^[66]的研究结果表明, 植物在感受机械胁迫时是能够产生miRNA, 其功能可能是在植物感受机械胁迫时, 植物产生结构上的适应性变化中发挥作用。

2.5 miRNA 与氧化胁迫

植物在正常和逆境环境中均能产生ROS。植物在长期的进化过程中发展了一套复杂有效的系统来维持体内ROS的平衡^[67, 68]。在正常生长条件下, 植物细胞产生的ROS能及时被自身的抗氧化系统所清除, 而当植物处于干旱、水淹、病害和紫外辐射等逆境环境中时, 将导致细胞内大量ROS的积累, 若不及时清除, 将对细胞造成严重伤害。超氧自由基(O_2^-)是ROS中的一种, 是叶绿体光合系统 电子传递过程的产物, O_2^- 应及时在其合成的部位被清除以免进一步产生危害更大的羟基自由基, 来完成这一任务是Cu-Zn超氧化物歧化酶 (Cu/Zn Superoxide

Dismutase, CSD), 该酶和 O_2^- 产生的位置均位于细胞叶绿体的类囊体上。Bowler等^[69]的研究发现, 氧化胁迫可以诱导CSD基因的表达来清除过多的 O_2^- 。

miRNA与植物抗氧化胁迫的关系来源于对模式植物拟南芥miRNA398 在调控CSD基因中的研究。研究表明, 氧化胁迫并不能诱导CSD1 和CSD2 基因转录产物的增加, 而对这两个CSD基因的正调控取决于miRNA398 水平^[25]。miRNA398 靶向于细胞质的CSD1 和质体的CSD2, 当植物处于正常生长情况下, 这两个基因同时转录, 但是由于在miRNA398 介导下的降解过程其转录产物并不累积; 当植物处于逆境胁迫下, miRNA398 的表达受到抑制, 释放其对CSD基因产物的抑制, CSD转录产物的积累表现出植物的抗氧化能力。转基因研究进一步揭示了miRNA398 在调控CSD2 基因表达中和氧化胁迫中的重要作用^[25]。目前已知的miRNA398 靶向的另外一个基因是细胞色素c 氧化酶V亚基^[13], 但其调控网络和是否参与植物的抗氧化过程还有待进一步研究。

2.6 miRNA 与其他逆境胁迫

Sunkar等^[11]构建了拟南芥幼苗经脱水、高盐、低温和ABA胁迫处理后的小分子RNA文库, 并对文库的测序结果进行分析, 发现了 26 个新的miRNAs, 它们来源于 15 个新的miRNA家族。利用miRNA与靶基因结合序列互补的特点, 预测了 41 个具有不同功能的靶基因。Northern分析表明, 许多miRNA受到一种或多种逆境胁迫的调控(正或负), 并表现组织特异性。如miRNA393 强烈受到低温、脱水、高盐和ABA的正调控; miRNA397b和miRNA402 受 4 种胁迫的正调控程度相对要小; 而miRNA319c仅受低温胁迫的正调控; miRNA389a同时受这 4 种胁迫的负调控。研究结果表明, 某些miRNA可能参与了与胁迫响应基因的表达及植株适应性变化。miRNA393 在逆境胁迫下靶向TIR1, 表明胁迫处理可能造成TIR1 mRNA的降解或翻译的抑制, 而TIR1 是生长素信号的正调控子, 作用在于促使泛素途径降解Aux/IAA蛋白^[70], 而对TIR1 mRNA的抑制能够负向的调节生长素信号和幼苗的生长, 因此, miRNA393 对TIR1 的正向调控有可能抑制逆境环境下植株的生长。受 4 种胁迫负调控的miRNA389a, 由于其靶向

的许多蛋白功能不明确,其调控机制还有待进一步研究。

3 植物逆境 miRNA 的研究方法

3.1 构建 miRNA 文库、克隆和测序

植物 miRNA 的研究始于拟南芥。2002 年, Reinhart^[71]、Llave^[72]和 Chen^[73]这 3 个研究小组分别从模式植物拟南芥中克隆得到了 16、125 和 11 个 miRNAs。随后,同样采用克隆的方法又分别从拟南芥^[74]、水稻^[19, 75]、小麦^[8]、玉米^[7]等植物中得到了大量 miRNA。因此,构建 miRNA 文库,克隆、测序是研究植物逆境胁迫相关 miRNA 的重要方法。如 Sunkar 和 Zhu^[11]构建了拟南芥幼苗的干旱、盐碱、低温、脱落酸胁迫的小分子 RNA 文库。对文库测序及分析后发现了 26 个未报道的 miRNA, Northern 分析表明,许多 miRNA 与逆境胁迫有关。植物逆境胁迫相关 miRNA 的克隆的基本策略为:首先构建逆境胁迫下长度为 16~28 nt 的小分子 RNAs 的 cDNA 文库,再将这些 cDNA 进行克隆、测序。然后将得到的克隆序列利用 NCBI 中的 BlastN 软件在该物种基因组数据库中进行同源性搜索,将具有同源性的基因组序列用 mfold 程序进行二级结构预测分析,最后将具有发夹结构的小分子 RNA 进行 Northern 杂交以检测其表达情况,最终将符合 miRNA 标准的小分子 RNA 鉴定为新的 miRNA。但是,由于 miRNA 的表达丰度较低以及具有组织及发育阶段的特异性,另外 mRNA 和其他内源性的非编码 RNA 的降解产物具有一定的干扰作用,测序克隆的选择也会造成与逆境胁迫相关 miRNA 的丢失,因此通过建文库的方法寻找与植物逆境有关的 miRNA 也存在着一定的局限性^[75, 76]。

3.2 结合生物信息学的 miRNA 研究方法

寻找物种内和物种间 miRNA 的序列或结构上的同源性是生物信息学方法研究 miRNA 的关键。许多来源于拟南芥和水稻的 miRNAs 都已通过实验证实其在结构上的保守性,而这一特征在物种间都是普遍存在的。对现已发现的植物 miRNA 的结构(一级结构和次级结构)进行分析后发现,它们一般位于编码基因间或者内含子反向重复区域,次级结构比一级序列更为保守,具有相似的前体结构,一些

miRNA 基因在进化上比较保守。利用这些特征进行基因组序列扫描就可鉴定潜在的 miRNA 基因。目前以前体 miRNA 二级结构为基础搜寻 miRNA 的计算机程序主要有 MiRatign、findMiRNA、MIRFINDER、MiScan 等,用于 miRNA 靶基因预测的程序有 MFOI、miRU。预测 miRNAs 基因基于 miRNAs 的以下两个主要特征:所有 miRNAs 都是长度为 20~24 nt 的非编码序列;所有 miRNAs 的前体序列都可以形成稳定的发卡环结构。但是,并不是所有 miRNAs 在进化过程中都具有保守性,也不是所有的能形成发卡环结构的都是 miRNA,如在 tRNAs 和 rRNAs 中也存在发卡环结构的保守性。miRNAs 基因的二级结构本身也具有多样性,不仅是简单的发卡环结构。由于生物信息学方法研究 miRNA 是基于 miRNA 在结构上的保守性,而对于非保守性的 miRNA 的研究就要困难得多,但是,随着高通量测序技术的应用于 miRNA 鉴定,一些非保守的 miRNA 也将被人们所发现。

3.3 利用 miRNA 芯片寻找逆境相关 miRNA

与基因芯片一样,miRNA 芯片是将反义 cDNA 探针点在尼龙膜上,然后再以 5 端放射性标记的小分子量 RNA 样品杂交,再经放射自显影获得信号。Zhou 等^[64]就是利用了 miRNA 芯片寻找与拟南芥 UV-B 辐射胁迫相关的 miRNA,并提出该方法可以运用到其他植物的逆境 miRNA 研究。目前,博奥生物芯片公司(<http://www.capitalbio.com/Exhibit/exhview.asp?pid=242>)推出了植物 miRNA 芯片,探针数目达到了 426 对,主要来源于水稻、拟南芥等 9 种植物中通过克隆或生物信息学预测得到的 miRNA。LCS CIENCE 公司(http://www.lcsciences.com/products/genomics/mirna_microarray/mirna_available_arrays.html)已开发出专门针对水稻、玉米和拟南芥 miRNA 芯片,其探针数目分别为 142、43 和 153。miRNA 芯片无疑是高通量检测与植物逆境相关 microRNA 表达情况的最佳选择,它可以在短时间内同时鉴定所有已知 miRNA 的表达谱。但是,miRNA 芯片只能检测到已知 miRNA 的表达情况,而对于未知的,特别是非保守的 miRNA 就不能进行有效的检测。克隆、生物信息学和 miRNA 芯片是目前寻找 miRNA 的主要方法,它们之间的结合同时也是一个相互验证的过程,

植物逆境miRNA研究可以通过直接克隆测序,再通过生物信息学对其结构和靶基因进行预测,同时利用基因芯片进行表达验证,能够准确有效地寻找与植物逆境胁迫有关的miRNA。

4 展望

植物逆境 miRNA 的发现是植物逆境分子生物学研究领域的一项重大突破,同时也提供给我们认识植物逆境胁迫下基因和基因表达调控本质的强有力工具。miRNA 约占总基因的 1%,这将意味着尚有许多 miRNA 正亟待我们发现,而对植物尤其是拟南芥、水稻等 miRNA 基因家族的鉴定工作表明,这些非编码小 RNA 是一种较为普遍的调节 RNA,它们在序列、结构、含量、表达及功能等方面都不同程度的表现出多样性。此外,miRNA 基因的表达比蛋白基因更迅速,它不受翻译过程影响,对目标基因表达的调控效率更高,这不仅仅丰富了对基因表达调控的认识,还帮助我们从一个更加深刻的角度理解基因的复杂性。逆境胁迫是影响作物生长和产量的重要因素,解决这一问题的前提是弄清作物的抗胁迫机制,miRNA 在参与植物逆境胁迫基因表达调控中的重要作用为我们理解这一复杂的生物学机制提供了新的认识,同时也为作物抗逆境胁迫研究指明了新的方向。

参考文献(References):

- [1] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338.[\[DOI\]](#)
- [2] Hake S. MicroRNAs: A role in plant development. *Curr Biol*, 2003, 13(21): 851–852.[\[DOI\]](#)
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.[\[DOI\]](#)
- [4] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5): 855–862.[\[DOI\]](#)
- [5] Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated micro-RNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019.[\[DOI\]](#)
- [6] Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1397–1411.[\[DOI\]](#)
- [7] Mica E, Gianfranceschi L, Pe ME. Characterization of five microRNA families in maize. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2601–2612.[\[DOI\]](#)
- [8] Yao YY, Guo GG, Ni ZY, Sunkar R, Du JK, Zhu JK, Sun QX. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome Biol*, 2007, 8(6): R96, 1–13.
- [9] Arazi T, Talmor Neiman M, Stav R, Riese M, Huijser P, Baulcombe DC. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J*, 2005, 43(6): 837–848.[\[DOI\]](#)
- [10] Mallory AC, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet*, 2006, 38(Suppl.): S31–S36.[\[DOI\]](#)
- [11] Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019.[\[DOI\]](#)
- [12] Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15(22): 2038–2043.[\[DOI\]](#)
- [13] 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.[\[DOI\]](#)
- [14] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(6818): 363–366.[\[DOI\]](#)
- [15] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19–53.[\[DOI\]](#)
- [16] Hammond SC, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404(6775): 293–96.[\[DOI\]](#)
- [17] Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(2): 225–232.[\[DOI\]](#)
- [18] Nick L, Archana K, Shawn C, Mark G, Mosse SP. MicroRNA172 down-regulate *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9412–9417.[\[DOI\]](#)
- [19] Mchalea NA, Koningb RE. MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana glauca* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1730–1740.[\[DOI\]](#)
- [20] Fowler S, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 2002, 14(8): 1675–1690.[\[DOI\]](#)
- [21] Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247–273.[\[DOI\]](#)
- [22] Kawaguchi R, Bailey SJ. Regulation of translational ini-

- tiation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 460–465. [\[DOI\]](#)
- [23] Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(2): 412–421. [\[DOI\]](#)
- [24] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006, 312(5772): 436–439. [\[DOI\]](#)
- [25] Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051–2065. [\[DOI\]](#)
- [26] Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, 1995.
- [27] Roghothama KG, Karthikeyan AS. Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, 2005, 274: 37–49. [\[DOI\]](#)
- [28] Raghothama KG. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 665–693. [\[DOI\]](#)
- [29] Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR. *PHO2*, microRNA399, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 2006, 141(3): 988–999. [\[DOI\]](#)
- [30] Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(7): 301–309. [\[DOI\]](#)
- [31] Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a non-sense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol*, 2006, 141(3): 1000–1011. [\[DOI\]](#)
- [32] Delhaize E, Randall PJ. Characterization of a phosphate accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995, 107(1): 207–213.
- [33] Pan BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 2008, 53(5): 731–738. [\[DOI\]](#)
- [34] Nikiforova VJ, Bielecka M, Gakiere B, Krueger S, Rinder J, Kempa S, Morcuende R, Scheible WR, Hesse H, Hoefgen R. Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids*, 2006, 30(2): 173–183. [\[DOI\]](#)
- [35] Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass AD, Touraine B. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J*, 1999, 18(1): 89–95. [\[DOI\]](#)
- [36] Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2000, 23(2): 171–182. [\[DOI\]](#)
- [37] Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough PB. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1697–1706. [\[DOI\]](#)
- [38] Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005, 139(1): 425–436. [\[DOI\]](#)
- [39] Yamisaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. Regulation of copper homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16369–16378. [\[DOI\]](#)
- [40] Kooter JM, Matzke MA, Meyer P. Listening to silent gene: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(9): 340–347. [\[DOI\]](#)
- [41] Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 2002, 296(5571): 1265–1269. [\[DOI\]](#)
- [42] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6894): 244–251. [\[DOI\]](#)
- [43] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279–289. [\[DOI\]](#)
- [44] Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 291–299. [\[DOI\]](#)
- [45] Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, 10(6): 937–946. [\[DOI\]](#)
- [46] Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J*, 2005, 24(17): 3147–3157. [\[DOI\]](#)
- [47] Lecellier CH, Voinnet O. RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol Rev*, 2004, 198: 285–303. [\[DOI\]](#)
- [48] Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin HL. A novel class of bacteria-induced smallRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2007, 21(23): 3123–3134. [\[DOI\]](#)
- [49] Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(29): 12157–12162. [\[DOI\]](#)
- [50] Padmanabhan C, Ramachandran V, Fauquet CM. MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(29): 10381–10386. [\[DOI\]](#)
- [51] Chory J, Chatterjee M, Cook R, Elich T, Fankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed J, Vitart V.

- From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22): 12066–12071. [\[DOI\]](#)
- [52] Jiao Y, Ma L, Strickland E, Deng X. Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3239–3256. [\[DOI\]](#)
- [53] Bjorn LO, Kendrick RE, Kronenberg GHM. Photomorphogenesis in Plants. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1994, 3–25.
- [54] de Gruijl FR, van der Leun JC. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Phys*, 1994, 67(4): 319–325.
- [55] Paul ND, Gwynn-Jones D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol Evol*, 2003, 18(1): 48–55. [\[DOI\]](#)
- [56] Ballare CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Robson TM, Caldwell MM, Sala OE, Scopel AL. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): an overview of recent progress. *J Photochem Photobiol B Biol*, 2001, 62(1-2): 67–77. [\[DOI\]](#)
- [57] Britt AB. DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 4: 75–100. [\[DOI\]](#)
- [58] Stapleton AE, Walbot V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet-radiation damage. *Plant Physiol*, 1994, 105(3): 881–889. [\[DOI\]](#)
- [59] Bieza K, Lois R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol*, 2001, 126(3): 1105–1115. [\[DOI\]](#)
- [60] Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda MLM, Chavez AQ, VegaraBS, Olszyk D. Response to oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiol Plant*, 1997, 101: 301–308. [\[DOI\]](#)
- [61] Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(4): 131–135. [\[DOI\]](#)
- [62] Casati P, Walbot V. Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays* L.) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biol*, 2004, 5(3): R16–R28. [\[DOI\]](#)
- [63] Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Ádám E, Edward JO, Schafer E, Nagy F. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 101(5): 1397–1402. [\[DOI\]](#)
- [64] Zhou XF, Wang GD, Zhang WX. UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, 2007, 3(103): 1–10.
- [65] Barnett JR. Secondary Xylem Cell Development. In: Xylem Cell Development. Tunbridge Wells, UK: Castle House Publications, 1981, 47–95.
- [66] Lu S, Sun YH, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2186–2203. [\[DOI\]](#)
- [67] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373–399. [\[DOI\]](#)
- [68] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(10): 490–498. [\[DOI\]](#)
- [69] Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, de Rycke R, Botterman J, Sybesma C, van Montagu M, Inzé D. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J*, 1991, 10(7): 1723–1732.
- [70] Dharmasiri S, Estelle M. The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 401–409. [\[DOI\]](#)
- [71] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616–1626. [\[DOI\]](#)
- [72] Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1605–1619. [\[DOI\]](#)
- [73] [73] Park W, Li JJ, Song RT, Messing J, Chen XM. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484–1495. [\[DOI\]](#)
- [74] Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 2003, 425(6955): 257–263.
- [75] Wang JF, Zhou H, Chen YQ, Luo QJ, Qu LH. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1688–1695. [\[DOI\]](#)
- [76] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853–858. [\[DOI\]](#)
- [77] Fahlgren N, Howell HD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie Jason, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangel JL, Carrington JC. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE*, 2007, 2: e219. [\[DOI\]](#)