

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.01018

植物microRNA与逆境响应研究进展

许振华, 谢传晓

中国农业科学院作物科学研究所, 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

摘要: MicroRNA (miRNA) 是一类在生物体内普遍存在的非编码、长度约 16~29 nt 的小分子 RNA, 由内源基因编码, 于转录后水平通过介导靶 mRNA 降解或翻译抑制调控基因表达, 是真核细胞基因表达的重要调控因子。随着生物信息学与研究技术的发展, 越来越多的植物 miRNA 得到预测和验证。逆境胁迫下, 植物体诱导或下调相关 miRNA 表达, 参与植物逆境生理调节与适应。文章综述了植物 miRNA 生物合成、与靶基因的作用方式、生物功能以及逆境胁迫响应 miRNA, 概要介绍了目前常用的 miRNA 研究方法。

关键词: 植物; microRNA; 逆境响应

Advances in plant microRNA and stresses response

XU Zhen-Hua, XIE Chuan-Xiao

National Key Facility for Crop Gene Resource and Genetic Improvement, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are endogenous 16–29 nt non-coding small RNAs that were generally found in species and typically encoded by endogenous genes. They play an important regulatory role at post-transcription level by targeting mRNA cleavage and translation repression. More and more plant miRNAs had been predicted and identified along with the development of bioinformatics and experimental techniques. At stress conditions, plant miRNAs also play a role in adaptation by up-regulating or down-regulating the miRNA expression. The biogenesis, action mode with target genes, biological functions of plant miRNAs, as well as the stress-responsive miRNAs, were reviewed and the methodologies of miRNA study were also briefly summarized in this paper.

Keywords: plant; microRNA; stresses response

MicroRNA(miRNA)是生物体内普遍存在的一种内源、非编码、小分子量的单链RNA分子,其前体具有发夹结构^[1,2]。miRNA长度约 16~29 nt,平均 22 nt,大部分为 21~23 nt^[3]。miRNA由内源miRNA基因编码产生^[4],通过与靶mRNA结合,在转录后水平介导靶mRNA降解或翻译抑制来调控基因表达^[1,5~7]。大部分植物miRNA基因位于基因间区域^[8~10],其他则位于基因内含子区域^[11]。有些植物如大

豆的一些miRNA基因相互距离很近,可形成基因簇^[12],共同转录形成同一个初级miRNA (pri-miRNA)。

自miRNA最早于线虫中发现以来^[13],大量miRNA在水稻^[14]、拟南芥^[15]、玉米^[16]、甘蓝型油菜^[17]等植物中陆续被预测,并且一部分miRNA已经由实验验证^[14,18~21],包括植物逆境胁迫响应miRNA^[22]。目前,miRNA数据库miRBase中(Release 14: 2009 年 9 月)包含 28 个物种的 2 134 条植物

收稿日期: 2010-01-22; 修回日期: 2010-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(编号: 30871535)资助

作者简介:许振华(1985-),男,在读硕士研究生,专业方向:玉米氮利用遗传与生理学基础。Tel: 13426421359; E-mail: xzhh0463@163.com

通讯作者:谢传晓(1972-),男,博士,副研究员,研究方向:玉米非生物逆境遗传、生理与分子育种。Tel: 010-82105853; E-mail: cxxie@caas.net.cn

miRNA序列及相关信息(<http://microrna.sanger.ac.uk>)。我们总结了该数据库现有的植物miRNA在 28 个物种中的分布并与该数据库Release 7.1(2005 年 10 月)^[23]植物miRNA数据进行比较(表 1)。水稻、小粒碗藓、毛果杨及拟南芥等几个物种中发现的miRNA较多;植物miRNA信息量增长较快,是Release 7.1的 2.7 倍;许多其他物种miRNA逐渐加入。随着高通量测序技术应用于小RNA文库测序,相信未来几年内,该数据库植物miRNA信息还会快速增长^[24,25]。

miRNA属于小RNA (Small RNA) 的一种^[10,26],由RNA聚合酶 转录生成^[11]。在植物新陈代谢、组织生长、器官发育及分化、细胞生长分化及程序性

凋亡中起重要作用,并能响应生物及非生物逆境胁迫,调节或改变内源基因表达^[27,28]。最初认为,miRNA在所有植物物种间都是保守的^[29],但随后发现,拟南芥一些miRNA在水稻中并不存在。Allen等^[30]提出植物miRNA进化模型,把miRNA分为“古老的”和“现代的”两类。该模型认为:“古老的”miRNA在植物分化为不同类群之前就已进化完成,这类miRNA是保守的;而“现代的”miRNA则是在现有植物种群都出现后才开始进化,是非保守的。很多植物miRNA高度保守并呈现出独特的组织及发育特异性或逆境特异性^[28]。在植物生长过程中,常会

表 1 miRBase 中 miRNA 在各植物间的分布

物种	Release 14		Release 7.1 ^[23]	
	miRNA 家族	成熟 miRNA	miRNA 家族	成熟 miRNA
水稻 (<i>Oryza sativa</i> L.)	152	452	46	178
小立碗藓(<i>Physcomitrella patens</i> L.)	111	281		
毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i> L.)	42	237	33	213
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	114	215	46	117
高粱(<i>Sorghum bicolor</i> L.)	25	140	16	72
葡萄(<i>Vitis vinifera</i> L.)	29	137		
蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i> L.)	27	116	10	16
玉米(<i>Zea mays</i> L.)	20	113	18	97
大豆(<i>Glycine max</i> L.)	53	86	11	22
江南卷柏(<i>Selaginella moellendorffii</i> L.)	45	64		
甘蓝型油菜(<i>Brassica napus</i> L.)	18	48		
洛矶山耧斗菜(<i>Aquilegia coerulea</i> L.)	20	45		
火炬松(<i>Pinus taeda</i> L.)	27	38		
小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.)	31	32		
番茄(<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	17	30		
二穗短柄草(<i>Brachypodium distachyon</i> L.)	17	19		
芜菁(<i>Brassica rapa</i> L.)	9	19		
甘蔗(<i>Saccharum officinarum</i> L.)	6	16	6	16
陆地棉(<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	6	13		
菜豆(<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8	9		
胡杨(<i>Populus euphratica</i> L.)	7	8		
甘蓝(<i>Brassica oleracea</i> L.)	5	7		
百脉根(<i>Lotus japonicus</i> L.)	2	2		
豇豆(<i>Vigna unguiculata</i> L.)	1	2		
雷蒙德氏棉(<i>Gossypium raimondii</i> L.)	1	2		
番木瓜(<i>Carica papaya</i> L.)	1	1		
草棉(<i>Gossypium herbaceum</i> L.)	1	1		
苹果(<i>Malus domestica</i> L.)	1	1		

受多种逆境胁迫影响,植物根据逆境种类及胁迫程度可自身调节体内相关基因表达水平,通过改变生理状态对逆境做出响应,某些 miRNA 在这一过程中起到重要作用。植物许多逆境响应正是通过诱导或抑制相应 miRNA 表达来调控相关基因表达水平,使植物适应不同程度的逆境胁迫。因此,通过不同生长环境、不同逆境或同一逆境不同胁迫程度的处理将会鉴定出更多新的 miRNA,揭示不同 miRNA 在逆境胁迫下的作用及植物对环境适应性机理。本文综述了植物 miRNA 生物合成、与靶基因的作用方式、生物功能以及逆境胁迫响应 miRNA,概要介绍了目前常用的 miRNA 研究方法。

1 miRNA的生物合成

在动物中,内源miRNA基因在RNA聚合酶 Ⅱ 作用转录生成初级miRNA(pri-miRNA),被一种称为 Drosha的RNA酶 Ⅲ 及其辅助因子DGCR8 作用切割,产生约 60~70 nt 具有茎环结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。植物与动物miRNA的生物合成差异主要体现在:植物中不存在Drosha的同源类似物,该过程是在Dicer的同源异形体DCL1^[10,31]及辅助因子HYL1 作用下完成^[10]。Pre-miRNA在转运蛋白 5 (exportin-5) 作用下进入细胞质,并被另一种称为 Dicer的RNA酶 Ⅲ 切割,去除pre-miRNA茎环结构的环状部分,产生约 16~29 bp的miRNA/miRNA* 杂合双链体分子。该双链体分子与RNA诱导的沉默复合物(RISC)中AGO蛋白(Argonaut)结合,随后双链体解链去除miRNA* 链,另一条仍与AGO蛋白结合的链,即为成熟单链miRNA分子。成熟miRNA与其靶mRNA靶位点互补结合,通过降解靶mRNA或抑制靶mRNA翻译调控内源基因表达^[10,32,33]。

2 植物miRNA的作用方式

植物miRNA与其靶基因(靶mRNA)相互作用方式分两种:剪切降解和翻译抑制。不同miRNA作用方式取决于miRNA与其靶位点的序列互补程度^[1,34]。一般,miRNA与靶mRNA完全互补或近完全互补时,会切割降解靶mRNA;两者不完全互补时,会抑制靶mRNA翻译^[35,36]。

与哺乳动物miRNA作用方式不同,植物miRNA介导的靶mRNA剪切是其主要作用方式。一般情况

下,植物 miRNA 作用方式与小分子量干扰 RNA (siRNA)相似,通过与其靶mRNA编码区特定位点以完全互补或近完全互补方式结合,在miRNA第 10 或 11 位碱基处^[37,38]精确切割并降解靶mRNA^[36,39,40]。与 miRNA合成途径相关的基因突变会导致miRNA含量显著下降,影响miRNA剪切作用,使靶mRNA含量显著上升^[41,42]。

哺乳动物miRNA一般以不完全互补方式与靶mRNA 3'-UTR结合^[43,44],通过抑制翻译起始因子或 Poly(A)尾巴的功能,来抑制靶mRNA翻译而并不降解靶mRNA^[5,45,46]。目前,植物中miRNA对靶mRNA翻译抑制的报道较少,但上述植物miRNA的剪切降解作用也并不绝对,个别miRNA靶位点位于靶mRNA 3'-UTR^[4];有些miRNA虽与其靶mRNA互补程度较高,但对其靶mRNA的作用并非剪切降解而是翻译抑制。如拟南芥miR172 与其靶基因AP2 mRNA高度互补,抑制AP2 蛋白表达,但没有检测到AP2 mRNA表达水平下降^[38,47]。

3 miRNA在植物体中的功能

miRNA一个显著特征是参与植物整个生长发育进程调控^[48]。因此,miRNA表达是植物正常生长发育所必需的。miRNA靶基因大多都编码调控蛋白等转录因子。表 2^[49]列出了靶基因为转录因子编码基因的某些拟南芥miRNA。

表 2 靶基因编码转录因子的植物 miRNA

miRNA	靶基因 家族	靶基因
miR156	SBP	<i>SPL2, SPL3, SPL4, SPL10</i>
miR159/319	MYB	<i>MYB33, MYB65</i>
	TCP	<i>TCP2, TCP3, TCP4, TCP10, TCP24</i>
miR160	ARF	<i>ARF10, ARF16, ARF17</i>
miR164	NAC	<i>CUC1, CUC2, NAC1, At5g07680, At5g61430</i>
miR169	HAP2	<i>At1g17590, At1g72830, At1g54160, At3g05690, At5g06510</i>
miR172	AP2	<i>AP2, TOE1, TOE2, TOE3</i>

同时还有一些miRNA靶基因并不编码转录因子,而是编码植物代谢过程中的重要蛋白质。例如某些miRNA靶基因编码F-box蛋白或泛素连接酶,说明这类miRNA具有调节蛋白稳定性的作用;某些miRNA靶基因编码ATP硫酸化酶、超氧化物歧化酶

(SOD)等植物代谢过程或逆境响应的关键酶; 还有一些miRNA靶基因为*DCL1* 或*AGO1* 等miRNA合成途径的重要基因, 表明这些miRNA还可调控自身合成和功能(表 3^[49])。不同miRNA通过调控基因表达过程中相应转录因子或代谢过程中相关蛋白表达来调节植物整个发育过程及生命进程。

表 3 靶基因编码非转录因子的植物 miRNA

miRNA	靶基因家族	靶基因
miR162	Dicer	<i>DCL1</i>
miR168	ARGONAUTE	<i>AGO1</i>
miR403	ARGONAUTE	<i>AGO2</i>
miR393	F-box	<i>TIR1</i> , <i>ABF1</i> , <i>ABF2</i> , <i>ABF3</i> , <i>At3g23690</i>
miR395	APS	<i>APS1</i> , <i>APS4</i>
	SO ₂ transporter	<i>AST68</i>
miR399	E2-UBC	<i>At2g33770</i>
miR397	Laccase	<i>At2g29130</i> , <i>At2g38080</i> , <i>At5g60020</i>

3.1 miRNA参与植物开花及花器官发育

某些miRNA通过调控与植物开花及花器官发育相关基因的表达, 参与植物生殖发育及花器官决定, 比较典型的是miR172。miR172 通过作用于包括AP2、TOE1、TOE2、GL15 等在内的APETALA2 转录因子编码基因, 在植物发育过程中起到控制植物开花时间^[50]、花器官发育^[48, 1]、花器官决定^[48, 1]及发育阶段转变^[52]等重要作用。过表达miR172 的拟南芥植株表现开花提前及花瓣缺失、萼片转变成心皮^[51]等花器官决定缺陷。AP2 类转录因子基因功能缺失分析表明, AP2 类转录因子为花器官抑制物。发育早期由miR172 介导的AP2 基因下调表达能缓解AP2 类转录因子对花器官的抑制, 促进开花。表达抗miR172 的AP2 基因会导致雄蕊增多、花器官分生组织无限扩展及花器官发育模式障碍^[48]。另一种AP2 类转录因子SMZ是一种有效地开花抑制物, 5'-RACE证明SMZ也是miR172 的靶基因, 过表达抗miR172 的SMZ基因的拟南芥植株长期维持营养生长, 表明miR172 对SMZ基因的作用会调控植物发育时期转变^[50]。Wu等^[52]发现转录因子SPL9 对miR172b的转录起直接作用, 而SPL为miR156 的靶基因, 因此miR156 还可调节miR172 的表达, 两者共同作用控制植物营养生长向生殖生长转变。

3.2 miRNA参与植物激素信号传导

研究发现, 某些miRNA在植物激素调节信号传导过程发挥重要作用。拟南芥*NAC1* 基因在侧根发生的生长素信号传导过程中起作用。miR164 直接作用于*NAC1* 基因, 下调*NAC1* mRNA表达, 影响生长素信号转导, 导致侧根数量减少; *mir164a*和*mir164b*突变体中miR164 丰度下降, *NAC1* 基因表达上调使侧根数量增加^[53]。生长素涉及植物生长发育各个方面, 一般通过生长素应答因子(ARF)基因发挥作用。在拟南芥中已经鉴定出 23 个ARF转录因子家族成员, 其中至少有 5 个ARF基因是miRNA靶基因, 分别为*ARF10*、*ARF16*、*ARF17*、*ARF6*和*ARF8*, 其中*ARF10*、*ARF16*、*ARF17* 是miR160 的靶基因, *ARF6*和*ARF8*是miR167 的靶基因^[40]。赤霉素(GA)也参与植物花器官形成及发育。植物体内miR159 水平受GA调节, miR159 作用于靶基因*GAMYB*(编码*GAMYB*转录因子, 参与GA启动的花器官分生组织决定基因*LEAFY*的激活), 调节短日照植物开花时间和花药发育^[54]。同时miR159 还受脱落酸(ABA)诱导表达, 通过作用于两个MYB转录因子基因*MYB33*和*MYB101* 在种子萌发过程中起作用^[55]。Jia等^[56]利用ABA处理拟南芥和毛果杨发现miR398 也受ABA诱导, 且表达模式在两个物种中不同, 表明miR398 可能与植物抗逆性相关。之前, miRNA参与细胞分裂素(CK)和乙烯(ETH)信号传导并无报道, 最近Liu等^[57]研究发现miR159、miR394 的表达受ETH调节; miR172、miR319 的表达受CK调节, 但这些miRNA参与CK和ETH信号传导途径及作用机制尚不明确。同时该研究还发现miR167、miR413 表达受ABA调节; miR166、miR319 表达受GA调节。

3.3 miRNA参与植物叶片发育

上文提到的miR172 除参与植物开花及花器官发育外, 还参与植物叶片从幼叶到成熟叶的转变。这一过程通过miR172 与*GLI5* 基因相互作用完成。玉米中过表达*GLI5* 表明该基因控制叶片由幼嫩向成熟转变, miR172 的表达下调*GLI5*, 使叶片转为成熟^[58]。miR319 作用于TCP转录因子基因, 过表达miR319 导致拟南芥叶片皱缩^[59]。

3.4 miRNA参与植物组织器官形态改变

CUC2 是NAC功能域转录因子家族成员之一,

miR164 作用于 *CUC2* 基因, 控制植物营养器官生长和侧向器官发育。*CUC2* 基因在 miR164 靶位点处的变异使 miR164 不能与 *CUC2* 结合, 导致 *CUC2* mRNA 过量表达, 植株与野生型相比表现出营养器官增大, 侧向器官再生等特点^[60]。拟南芥过表达 miR156 下调 *SPL* 基因表达, 与野生型相比, 植株开花延迟, 基部莲座叶发生较早, 顶端优势明显减弱, 且初花倾向于从侧枝处发生, 侧枝叶片数目显著增多^[40, 61]。

3.5 miRNA 参与自身代谢负反馈调节

miRNA 除参与植物体生命代谢活动及发育进程外, 还参与自身代谢合成的负反馈调节。如 miR162 剪切产物中含有 *DCL1* 的转录本, 而 *DCL1* 基因编码 miRNA 合成过程中的关键酶 Dicer, 说明 miR162 对 Dicer 酶具有负反馈调节功能^[62]。表达抗 miR168 的 *AGO1* 基因增加植株体内 *AGO1* 转录本水平, 并具有与 miRNA 合成途径中关键突变如 *dcl1*、*gen1*、*hyl1* 等相似的发育缺陷表型。而人为导入与抗 miR168 的 *AGO1* mRNA 互补的 miRNA, 则可以使缺陷表型回复至野生型^[42]。这些都表明某些 miRNA 在自身合成途径中存在负反馈调节功能。

4 植物逆境胁迫响应 miRNA

最近研究表明, 植物中不同的 miRNA 对多种逆境胁迫发生响应, 并证实某些 miRNA 在植物感受逆境胁迫并产生适应性的过程中发挥重要作用^[14, 63]。植物生长过程中可能遇到的逆境胁迫分为生物逆境和非生物逆境, 生物逆境主要是虫害、病害等; 非生物逆境包括养分胁迫、干旱胁迫、低温胁迫、淹水胁迫和高盐胁迫等。不同逆境胁迫会诱导或下调表达植物相应 miRNA, 有时某种 miRNA 会同时响应几种逆境胁迫。尽管大多数 miRNA 参与逆境胁迫响应机理尚不明确, 但随着研究的深入, miRNA 将为我们阐明植物逆境胁迫响应机理和提高植物耐胁迫能力提供重要参考。

4.1 miRNA 与植物养分胁迫

4.1.1 miRNA 与低氮胁迫

氮是植物三大营养元素之一, 对植物生长发育具有重要作用。虽然与植物氮素响应 miRNA 相关的

报道很少, 但有研究显示某些 miRNA 在低氮情况下表达发生改变。如 miR167a 在低氮胁迫下诱导表达, 导致靶基因 *ARF8* 表达下调, *ARF8* 控制侧根结构, 因此, miR167a 在响应低氮胁迫过程中调节侧根生长^[64]。Bikram 等^[19]用实时定量 PCR 方法研究了拟南芥营养元素响应的 miRNA, 发现低氮抑制 miR169 和 miR398 表达。miR169 的靶基因 *HAP2-1* 调控根瘤原基分化, 过表达 miR169 或敲除 *HAP2-1* 基因均会抑制侧根形成^[65]。这说明低氮水平下, miR169 在豆科植物根瘤发育过程中起重要作用。中国农业科学院作物科学研究所(本研究组)正在开展玉米 miRNA 对低氮响应及其在基因表达调控中角色鉴定等研究, 已取得了一些初步有意义的结果, 将陆续发表。

4.1.2 miRNA 与低磷胁迫

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因素。目前大量研究对低磷胁迫诱导基因包括 miRNA 表达和调控在一定程度上揭示了 miRNA 低磷响应机制, 但其详细调控机制仍不明确^[66]。拟南芥 miR399 能够对低磷胁迫发生响应并保持体内磷素稳定平衡^[67]。拟南芥基因组中分布有 6 个 miR399 基因, 均受低磷胁迫诱导^[66]。研究表明, 无机磷转运子 (Pi transporter)^[68] 和泛素结合酶 (UBC24)^[15] 两个基因家族为 miR399 的靶基因, 共同调节植物体内磷素平衡。miR399 受介质中磷酸盐水平调节^[55, 69], 低磷酸盐水平强烈诱导 miR399 表达, 其靶 mRNA 丰度下降首先在根部出现。miR399 通过与 *UBC24* mRNA 的 5'-UTR 结合下调其表达, 同时 *UBC24* mRNA 的 5'-UTR 区已被证实与植物缺磷响应有关^[69]。miR399 参与体内磷素平衡模型指出^[69, 70], 高磷环境下, 根部表达的 *UBC24* 可能会下调特异磷吸收转运系统的表达, 从而抑制过量无机磷进入植物体内; 缺磷时, miR399 表达量增加, *UBC24* 表达下调, 从而缓解了被抑制的无机磷吸收和转运, 增加植物对无机磷的吸收以应对磷素缺乏。最近研究发现, 缺磷诱导拟南芥 miR778、miR827 表达, 但下调 miR398 表达^[19]。miR827 的靶基因是 E3 连接酶 *NLA* (*At1g0260*), *NLA* 参与植物花青素合成, *nla* 突变体在缺氮条件下花青素含量下降, 叶片早衰; 但磷和氮素同时缺乏时, 突变体表现野生型。表明尽管 miR827 会抑制 *NLA* 表达, 但缺磷作为一种信号, 足

以诱导花青素合成, 弥补 miR827 对 *NLA* 的抑制。

4.1.3 miRNA 与缺硫胁迫

植物在低硫胁迫下一些 miRNA 也参与缺硫响应, 如 miR395 在维持拟南芥硫素平衡中起重要作用^[71]。拟南芥 miR395 靶基因有两种: 一种是 *APS1*、*APS3* 和 *APS4* 等 ATP 硫酸化酶基因, 其编码蛋白催化硫酸同化反应第一步^[68]; 另一个是 *AsT68*, 编码一种硫酸盐转运蛋白, 负责将无机硫由根系转运至茎叶^[30]。说明 miR395 能同时调节同一代谢途径中的两组不同基因。研究表明, 低硫胁迫诱导 miR395 的同时, *APS1* 表达下调; 硫素水平正常时, *APS1* 转录水平增加, miR395 表达完全受到抑制^[68]。证实了 miR395 在植物低硫胁迫响应过程中的作用。

4.1.4 miRNA 与微量元素

miRNA 不仅响应大量元素缺乏, 也会响应一些微量元素含量变化并调节相应生理活动。研究发现, 缺铜会抑制 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (Cu/Zn-superoxide dismutase, CSD) 表达, 其在叶绿体中的作用被 Fe 超氧化物歧化酶 (Fe-superoxide dismutase) 代替, miR398 在该过程中发挥重要作用^[72]。铜素缺乏时, miR398 的诱导表达使 *CSD* 基因表达下调。Abdel-Ghany 等^[73] 研究发现, 除 miR398 外, 拟南芥 miR397、miR408、miR857 也受低铜诱导表达, 表明通过 miRNA 的作用, 可以下调植物体内非必须铜蛋白表达, 减少铜素消耗, 从而在缺铜情况下, 保证植物体正常生理活动必须铜素的供应。

4.2 miRNA 与干旱胁迫

干旱对植物生长影响很大, 实验表明干旱诱导水稻 miR169g 表达^[21]。miR169g 是 miR169 家族唯一受干旱诱导的 miRNA, 且在根部表达量比茎部高, 表明 miR169g 在根组织快速响应干旱胁迫中起重要作用, 同时还表明干旱胁迫时 miRNA 在叶片与根组织细胞中可能参与不同的信号转导过程^[21]。干旱胁迫抑制拟南芥 miR169a 和 miR169c 表达, 过表达 miR169a 的植株, 较野生型表现出叶片易失水和抗旱能力减弱等特点^[74]。Wei 等^[75] 通过 miRNA 芯片杂交实验表明, 干旱胁迫下, 来自 13 个物种的 34 个 miRNA 表达显著变化。这些 miRNA 靶基因大部分都含有干旱胁迫下 ABA 响应元件。miR474 受干旱胁迫诱导, 其靶基因 *PDH* 是脯氨酸积累过程的负调控元

件。干旱胁迫抑制 miR168、miR528、miR167 表达, 各自靶基因 (*MAPK*、*POD*、*PLD*) 表达上调, 启动 ABA 诱导的气孔运动和抗氧化防御。

4.3 miRNA 与低温胁迫

低温是限制植物生长和分布的一种非生物胁迫因素, 多种 miRNA 可通过调控生长素或脱落酸信号途径, 响应植物低温胁迫。最初 Sunkar 等^[15] 利用不同胁迫处理拟南芥幼苗并构建小 RNA 文库, 通过筛选表明低温胁迫诱导 miR393、miR397 表达。Zhang 等^[76] 和 Liu 等^[63] 分别通过全基因组测序及芯片杂交方法证实低温诱导 miR397 表达。芯片杂交实验还表明低温诱导拟南芥 miR172、miR171、miR169、miR408^[63] 及毛果杨 miR477、miR168 表达^[77]; 但抑制毛果杨 miR156、miR475、miR476 表达^[77]。Zhou 等^[20] 基于转录组预测方法鉴定了拟南芥 miR398 也受低温诱导表达。

4.4 miRNA 与高盐胁迫

土壤盐度是农作物生长的重要限制因素, 近年来通过对逆境响应 miRNA 的研究, 鉴定了一些盐胁迫响应 miRNA。拟南芥 miR397 在高盐条件下上调表达, 导致 *LACs* 和 *CKB3* mRNA 表达水平下降。转 miR397 基因的拟南芥植株, 抗盐性提高; 相反, 抗 miR397 的转基因拟南芥, 耐盐能力减弱^[15]。Liu 等^[63] 借助芯片杂交在拟南芥中鉴定了 miR396 和 miR168 等 12 种盐胁迫诱导表达 miRNA。Jia 等^[56] 研究了盐胁迫处理下拟南芥与毛果杨 miRNA 的时序表达, 结果表明, 盐胁迫下, 毛果杨 miR398 上调表达, 但表达量随时间不断变化; 而在拟南芥中 miR398 表达受盐胁迫抑制, 且表达量恒定。Guru 等^[78] 证实包括高盐胁迫在内的多种逆境抑制 miR398 表达。

4.5 miRNA 与其他逆境胁迫

植物生长过程中, 除以上几种逆境胁迫外, 还会遇到生物胁迫、紫外线照射、重金属、氧化、淹水等一些其他形式的逆境胁迫, 植物体响应这些逆境时, 同样存在 miRNA 对生理活动的调节。例如, 病原菌侵染植物叶片会使 miR398 表达量下降^[78]。土壤重金属含量过高时, miR398 通过与超氧化物歧化酶基因 (*CSD*) 相互作用调节植物体内铜素平衡; miR393 和 miR171 在植物响应镉胁迫时起重要作用^[79]。Zhou

等^[80]研究了重金属(Hg、Cd和 Al)对蒺藜苜蓿miRNA表达的影响,发现miRNA在重金属胁迫时表达不一致,并与重金属种类和浓度有关。miR171、miR319、miR393 和miR529 在重金属胁迫时表达上调。其中miR319 被Cd 和Al诱导,miR393 被Hg和Cd诱导。miR529 被上述 3 种重金属同时诱导表达,且Al的诱导效应最强。Zhou等^[81]研究了拟南芥在紫外线(UV-B)胁迫下miRNA表达,结果表明包括miR159、miR398 在内的多种miRNA可能受UV-B诱导表达。Zhang等^[82]研究了玉米在淹水胁迫下miRNA对根细胞形态及代谢的调节作用,表明多种miRNA在淹水胁迫下表达发生改变,并呈现出表达模式的动态性及多样性。另外,上述逆境胁迫很多都伴有氧化胁迫存在,miR398 是植物响应氧化胁迫的主要miRNA,氧化胁迫下表达下调,并通过与靶基因CSD相互作用行使功能^[83]。

5 植物miRNA研究方法

5.1 miRNA的获得

5.1.1 miRNA 功能缺失突变体

这种方法获得新miRNA的效率最低,因为自然状态下miRNA功能缺失突变体非常少见。迄今为止,只有拟南芥miR164 是通过功能缺失突变体获得的^[84]。显然该方法不能高效获得miRNA。

5.1.2 小 RNA 克隆

小RNA直接克隆是获得miRNA比较有效、可信的方法。植物中最早采用克隆方法获得包括 15 个miRNA家族在内的 19 个miRNA成员^[85]。高通量测序方法的建立,使获得大量miRNA序列信息成为可能。该方法在miRNA发现和鉴定中还会有重要应用。

5.1.3 生物信息学预测

根据miRNA前体序列特征,通过生物信息学方法在全基因组中预测miRNA 是获得miRNA最常用的方法。相对于直接克隆法,生物信息学预测可获得一些表达水平低、组织特异性表达以及特定环境诱导表达的miRNA。利用miRNA序列特征设计的植物miRNA预测程序,已经在预测和鉴定新miRNA中得到广泛应用^[14~17]。利用生物信息学预测得到的miRNA需经过生物学实验验证^[18~21]。

5.2 miRNA的生物学验证

除以上获得新miRNA的方法外,有些研究可能会借助miRNA表达谱芯片等方法筛选与研究目标相关的miRNA^[63,82],这些筛选到的miRNA同样需要生物学实验验证。

5.2.1 Northern 杂交

Northern 杂交作为应用最广泛的验证目标miRNA的方法,已用于许多miRNA的生物学验证^[14,15,20,21,25,54]。其优点是不需要特殊实验仪器及实验技能,且能反映miRNA表达量及miRNA分子大小。但该方法灵敏度低,尤其是待检测miRNA丰度较低时,低灵敏度缺点就更突出。因此,Northern杂交通常需要大量总RNA样品。Válóczi等^[86]将锚定核苷酸(Locked nucleotide acid, LNA)修饰的寡核苷酸探针用于成熟miRNA的Northern杂交,大大提高了杂交灵敏度;Várallyay等^[87,88]详细阐述了LNA探针用于成熟miRNA的Northern杂交方法。商业化的LNA修饰探针可从Exiqon (<http://www.exiqon.com>)获得。Pall等^[89]利用可溶性碳化二亚胺(EDC)代替紫外交联等方法用于RNA固定,极大提高了miRNA检测效率,比传统紫外交联固定效率高 25~50 倍。

5.2.2 实时定量 PCR

实时定量PCR(Real-time PCR)利用PCR产物的荧光信号与目标产物拷贝数关系实现目标 miRNA 的检测和定量。这种方法灵敏度高,只用少量初始RNA样品便可获得精确结果。但这种方法需要设计特异性引物及探针,且实验结果受体系、操作及环境影响较大。

miRNA的Real-time PCR检测方法在前体^[90]和成熟miRNA中不同,主要体现在引物和探针设计及反转录差异。Chen等^[91]发展了一种新的用于成熟miRNA的Real-time PCR方法。该方法引进特异的茎环反转录引物(Stem-loop RT primer)用于成熟miRNA反转录。利用TaqMan MGB探针能提高检测特异性,可区分甚至 1 个碱基差异,适于miRNA家族不同成员的Real-time PCR检测。针对成熟miRNA反转录及PCR扩增,Shi等^[92]和Raymond等^[93]还分别提出引物延伸法和Poly A加尾法。前体及成熟miRNA的引物及探针设计参阅文献^[90]。

5.2.3 miRNA 抑制剂

miRNA抑制剂是一种与目标miRNA序列特异性互补并经过一定化学修饰的反义寡核苷酸(ASO)序列。一般通过对这种反义RNA分子核糖 2'-氧甲基化保证其在体内稳定性^[94, 95]。借助转染试剂进入细胞后,抑制剂可快速稳定地同目标miRNA分子互补结合,从而阻止miRNA与靶基因结合来抑制miRNA功能。也有研究利用锚定核苷酸(LNA)来修饰反义寡核苷酸^[96]。

5.3 miRNA靶基因预测

靶基因预测是 miRNA 功能及后续研究的基础。生物信息学方法预测 miRNA 靶基因主要基于 miRNA 与靶基因相互作用的热力学稳定性、二级结构分析以及 miRNA 与靶基因互补的序列特征。表 4、表 5 分别列出了植物 miRNA 及靶基因预测的数据库网站及软件。

基因本体(Gene ontology, GO)可分析已知或预测的miRNA靶基因分子功能及参与的生物学过程,为后续靶基因验证提供重要参考。产生的层级树形图能够清晰显示各靶基因功能及层级分类。Zhang^[103]利用GO的分子功能和生物学过程两个本体分析了玉米所有miRNA靶基因,表 6 列出部分分析结果。

各种 miRNA 靶基因功能几乎涵盖了植物生命活动各方面,同一种 miRNA 靶基因可行使不同的分子功能并参与不同生物学过程。另一方面,不同靶基因在功能或参与的生物学过程中分布频率存在差异。这些信息对于深入了解 miRNA 及其靶基因功能具有重要参考价值。

表 4 植物 miRNA 与靶基因数据库及其链接

数据库	地址	主要特征	参考文献
mirBase	http://www.mirbase.org/	miRNA 序列、注释及预测的靶基因	[23]
PMDB	http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/	已知植物 miRNA 及其靶基因信息	[97]
CSRDB	http://sundarlab.ucdavis.edu/smrnas/	已知玉米、水稻小 RNA(含 miRNA)信息	[98]
ASRP	http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/	拟南芥 miRNA 序列及相关靶基因	[99]

表 5 植物 miRNA 靶基因在线预测程序及其链接

程序名称	获取地址	物种	参考文献
MicroInspector	http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/	任何物种	[100]
miRU	http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm	植物	[101]
miTarget	http://cbiit.snu.ac.kr/~miTarget/	任何物种	[102]

5.4 miRNA靶基因验证

靶基因验证主要内容是验证靶基因与目标 miRNA 之间相互作用及靶基因生物功能,一般有以下几种方法。

5.4.1 剪切产物 5'-RACE

剪切产物 5'-RACE法是植物中最常用的验证 miRNA靶基因的方法。一般植物miRNA与其靶基因作用方式是通过剪切作用降解靶mRNA, 5'-RACE通过对剪切产物末端扩增测序验证miRNA对靶基因的剪切作用,同时该方法得到的末端产物与miRNA序列比对后还可得到miRNA精确剪切位点^[38]。许多研究都用该方法验证了miRNA靶基因^[38, 104~106],并且表明,这种剪切作用通常精确发生在miRNA第 10 或 11 位碱基处^[37, 38]。

5.4.2 农杆菌注射

农杆菌注射(Agro-inoculation)法属于瞬时表达的一种,一般利用 35S启动子分别构建miRNA及其靶基因表达载体,然后借助农杆菌注射接种植物叶片,使两种表达载体在植物活体组织内共表达(Co-expression)^[38]。

5.4.3 表达抗 miRNA 靶基因

表达抗性靶基因方法是指在预测的 miRNA 靶位点处引入多个碱基突变,使目标 miRNA 不能与靶

表 6 玉米 miRNA 靶基因 GO 分析

基因本体	GO 编号	功能描述	频率	miRNA 家族
GO 分子功能	5488	结合	154/187 82.3%	miR1432; miR156; miR159; miR160; miR164; miR166; miR167; miR168; miR169; miR171; miR172; miR319; miR390; miR393; miR396; miR397; miR399; miR408; miR482; miR528; miR529; miR827
	30528	转录调控活性	21/187 11.2%	miR156; miR164; miR166; miR169; miR172; miR528; miR529
	3700	转录因子活性	20/187 10.6%	miR156; miR166; miR169; miR172; miR528; miR529
	4779	硫酸腺苷酰转移酶活性	2/187 1.0%	miR395
GO 生物学过程	51869	应激响应	35/187 18.7%	miR156; miR159; miR160; miR164; miR166; miR167; miR172; miR396; miR397; miR399; miR528
	9719	内源刺激响应	14/187 7.4%	miR160; miR167
	9725	激素响应	14/187 7.4%	miR160; miR167
	50791	生物过程调节	66/187 35.2%	miR156; miR159; miR160; miR164; miR166; miR167; miR168; miR169; miR172; miR319; miR396; miR408; miR482; miR528; miR529
	10468	基因表达调控	60/187 32.0%	miR156; miR160; miR164; miR166; miR167; miR169; miR172; miR319; miR396; miR408; miR528; miR529
	6817	磷酸盐转运	5/187 2.6%	miR399
	103	硫酸盐同化	2/187 1.0%	miR395

基因结合, 同时不改变靶基因编码蛋白序列, 来验证目标miRNA与靶基因相互作用。已有研究表明, 该方法是一种有效验证miRNA靶基因的方法^[48, 107]。

5.4.4 转基因过表达目标 miRNA

转基因过表达目标 miRNA 也是一种常用的 miRNA 靶基因及功能验证方法。根据 miRNA 前体序列设计引物, PCR 克隆得到 miRNA 前体, 并连接在过表达载体启动子与终止子之间^[63, 108], 也有报道同时将两个 miRNA 前体连在一起构建过表达载体, 使两种 miRNA 同时表达^[109]。

6 结 语

miRNA 是生物体内一类重要的小 RNA, 具有调控生物体的生长发育、细胞程序性死亡以及新陈代谢等多种功能。miRNA 的发现是 RNA 研究领域一个里程碑式的突破, 其生物学及功能的研究已成为分子生物学领域的热点。目前, 在植物中虽已鉴定出大量 miRNA, 某些 miRNA 在植物生长发育过程中的功能及作用机制逐渐得以验证, 但大部分 miRNA 作用机理尚不明确。随着对模式植物 miRNA 形成、功能及作用机制深入研究及针对 miRNA 研究方法不断改进, miRNA 在植物体中的生物学功能、作用机制与生长发育调控途径将会得到更清晰地阐释。此外, miRNA 也具有重要的应用价值, 如

miRNA 转基因便具有较好的应用前景, 可以把当前功能验证已鉴定的 miRNA 构建表达载体, 通过转基因过表达获得某种特定改良性状的转基因植株。

参考文献(References):

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. [\[DOI\]](#)
- [2] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 2003, 9(3): 277–279. [\[DOI\]](#)
- [3] Zhang BH, Stellwag EJ, Pan XP. Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs. *Gene*, 2009, 443(1–2): 100–109. [\[DOI\]](#)
- [4] Mica E, Gianfranceschi L, Pè ME. Characterization of five microRNA families in maize. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2601–2612. [\[DOI\]](#)
- [5] Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 16961–16966. [\[DOI\]](#)
- [6] Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Padova FD, Lin SC, Gram H, Han J. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, 2005, 120(5): 623–634. [\[DOI\]](#)
- [7] Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev*, 2006,

- 20(7): 759–771. [\[DOI\]](#)
- [8] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853–858. [\[DOI\]](#)
- [9] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 2002, 16(6): 720–728. [\[DOI\]](#)
- [10] Voinnet O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 669–687. [\[DOI\]](#)
- [11] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051–4060. [\[DOI\]](#)
- [12] Zhang B, Pan X, Stellwag EJ. Identification of soybean micro-RNAs and their targets. *Planta*, 2008, 229(1): 161–182. [\[DOI\]](#)
- [13] 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. [\[DOI\]](#)
- [14] Jian XY, Zhang L, Li GL, Zhang L, Wang XJ, Cao XF, Fang XH, Chen F. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. *Genomics*, 2010, 95(1): 47–55. [\[DOI\]](#)
- [15] Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019. [\[DOI\]](#)
- [16] Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Lett*, 2006, 580(15): 3753–3762. [\[DOI\]](#)
- [17] Xie FL, Huang SQ, Gou K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, Yang ZM. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1464–1474. [\[DOI\]](#)
- [18] Sunkar R, Jagadeeswaran G. *In silico* identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 37–49. [\[DOI\]](#)
- [19] Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible WR. Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol*, 2009, 150(3): 1541–1555. [\[DOI\]](#)
- [20] Zhou XF, Wang GD, Sutoh K, Zhu JK, Zhang WX. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(11): 780–788.
- [21] Zhao BT, Liang RQ, Ge LF, Li W, Xiao HS, Lin HX, Ruan KC, Jin YX. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(2): 585–590. [\[DOI\]](#)
- [22] 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. [\[DOI\]](#)
- [23] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D140–D144. [\[DOI\]](#)
- [24] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3407–3425. [\[DOI\]](#)
- [25] 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. [\[DOI\]](#)
- [26] Phillips JR, Dalmay T, Bartels D. The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Lett*, 2007, 581(19): 3592–3597. [\[DOI\]](#)
- [27] Wang Y, Stricker HM, Gou D, Liu L. MicroRNA: past and present. *Front Biosci*, 2007, 12: 2316–2329. [\[DOI\]](#)
- [28] Yin JQ, Zhao RC. Identifying expression of new small RNAs by microarrays. *Methods*, 2007, 43(2): 123–130. [\[DOI\]](#)
- [29] Floyd SK, Bowman JL. Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature*, 2004, 428(6982): 485–486. [\[DOI\]](#)
- [30] Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 2004, 36(12): 1282–1290. [\[DOI\]](#)
- [31] Millar AA, Waterhouse PM. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5(3): 129–135. [\[DOI\]](#)
- [32] Kong W, Zhao JJ, He LL, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol*, 2009, 218(1): 22–25. [\[DOI\]](#)
- [33] Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009: 594678.
- [34] Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Lett*, 2006, 580(15): 3752–3762.
- [35] Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003, 4(7): R42. [\[DOI\]](#)
- [36] Tang GL, Reinhart BJ, Bartel DP. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 49–63. [\[DOI\]](#)

- [37] Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell*, 2003, 4(2): 205–217. [\[DOI\]](#)
- [38] Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053–2056. [\[DOI\]](#)
- [39] Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol Cell*, 2005, 19(3): 421–428. [\[DOI\]](#)
- [40] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 2002, 110(4): 513–520. [\[DOI\]](#)
- [41] Vazquez F, Gasciolli V, Cr  t   P, Vaucheret H. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol*, 2004, 14(4): 346–351.
- [42] Vaucheret H, Vazquez F, Cr  t   P, Bartel DP. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*, 2004, 18(10): 1187–1197. [\[DOI\]](#)
- [43] 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. [\[DOI\]](#)
- [44] Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, 2002, 9(6): 1327–1333. [\[DOI\]](#)
- [45] Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 827–835. [\[DOI\]](#)
- [46] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 2005, 309(5740): 1573–1576. [\[DOI\]](#)
- [47] Chen XM. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303(5666): 2022–2025. [\[DOI\]](#)
- [48] Chen XM. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5923–5931.
- [49] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19–53. [\[DOI\]](#)
- [50] Mathieu J, Yant LJ, Murdter F, Kuttner F, Schmid M. Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. *PLoS Biol*, 2009, 7(7): e1000148. [\[DOI\]](#)
- [51] Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2730–2741. [\[DOI\]](#)
- [52] Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138(4): 750–759. [\[DOI\]](#)
- [53] Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1376–1386. [\[DOI\]](#)
- [54] Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 2004, 131(14): 3357–3365. [\[DOI\]](#)
- [55] 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. [\[DOI\]](#)
- [56] Jia XY, Wang WX, Ren LG, Chen QJ, Mendu V, Willcut B, Dinkins R, Tang XQ, Tang GL. Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(1–2): 51–59. [\[DOI\]](#)
- [57] Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ. Expression analysis of phytohormone regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett*, 2009, 583(4): 723–728. [\[DOI\]](#)
- [58] Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9412–9417. [\[DOI\]](#)
- [59] Palatnik JF, Allen E, Wu XL, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 2003, 425(6955): 257–263. [\[DOI\]](#)
- [60] Larue CT, We JQ, Walker JC. A microRNA–transcription factor module regulates lateral organ size and patterning in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 58(3): 450–463. [\[DOI\]](#)
- [61] Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*, 2005, 8(4): 517–527. [\[DOI\]](#)
- [62] Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 784–789. [\[DOI\]](#)
- [63] Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC. Microar-

- ray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 2008, 14(5): 836–843. [\[DOI\]](#)
- [64] Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 803–808. [\[DOI\]](#)
- [65] Combier JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev*, 2006, 20(22): 3084–3088. [\[DOI\]](#)
- [66] 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. [\[DOI\]](#)
- [67] Pant 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. [\[DOI\]](#)
- [68] 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. [\[DOI\]](#)
- [69] 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. [\[DOI\]](#)
- [70] Chiou TJ. The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell Environ*, 2007, 30(3): 323–332. [\[DOI\]](#)
- [71] 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. [\[DOI\]](#)
- [72] 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. [\[DOI\]](#)
- [73] Abdel-Ghany SE, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein Expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15932–15945. [\[DOI\]](#)
- [74] Li WX, Oono Y, Zhu J, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2238–2251. [\[DOI\]](#)
- [75] Wei LY, Zhang DF, Xiang F, Zhang ZX. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *Int J Plant Sci*, 2009, 170(8): 979–989. [\[DOI\]](#)
- [76] Zhang JY, Xu YY, Huan Q, Chong K. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 2009, 10: 449. [\[DOI\]](#)
- [77] Lu SF, Sun YH, Chiang VL. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant J*, 2008, 55(1): 131–151. [\[DOI\]](#)
- [78] Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 229(4): 1009–1014. [\[DOI\]](#)
- [79] Ding YF, Zhu C. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 6–10. [\[DOI\]](#)
- [80] Zhou ZS, Huang SQ, Yang ZM. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(3): 538–542. [\[DOI\]](#)
- [81] Zhou XF, Wang GD, Zhang WX. UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 103.
- [82] Zhang ZX, Wei LY, Zou XL, Tao YS, Liu ZJ, Zheng YL. Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Ann Bot*, 2008, 102(4): 509–519. [\[DOI\]](#)
- [83] 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. [\[DOI\]](#)
- [84] Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM. The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15(4): 303–315. [\[DOI\]](#)
- [85] Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1605–1619. [\[DOI\]](#)
- [86] Válczy A, Hornyik C, Varga N, Burgán J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e175. [\[DOI\]](#)
- [87] Várallyay E, Burgán J, Havelda Z. Detection of microRNAs by northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 2007, 43(2): 140–145. [\[DOI\]](#)

- [88] Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 190–196. [\[DOI\]](#)
- [89] Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(8): e60. [\[DOI\]](#)
- [90] Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang JM, Sarkar A, Yang LQ, Elton TS, Chen CF. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 2008, 44(1): 31–38. [\[DOI\]](#)
- [91] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179. [\[DOI\]](#)
- [92] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*. 2005, 39(4): 519–525. [\[DOI\]](#)
- [93] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*, 2005, 11(11): 1737–1744. [\[DOI\]](#)
- [94] Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, 2004, 10(3): 544–550. [\[DOI\]](#)
- [95] Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, 2004, 2(4): 465–475.
- [96] Ørom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene*, 2006, 372(1–2): 137–141. [\[DOI\]](#)
- [97] Zhang ZH, Yu JY, Li DF, Zhang ZY, Liu FX, Zhou X, Wang T, Ling Y, Su Z. PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D806–813. [\[DOI\]](#)
- [98] Johnson C, Bowman L, Adai AT, Vance V, Sundaresan V. CSRDB: a small RNA integrated database and browser resource for cereals. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D829–833. [\[DOI\]](#)
- [99] Gustafson AM, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington JC, Kasschau KD. ASRP: The *Arabidopsis* small RNA project database. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(database issue): D637–D640. [\[DOI\]](#)
- [100] Rusinov V, Baev V, Minkov IN, Tabler M. MicroInspector: A web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(web server issue): W696–W700. [\[DOI\]](#)
- [101] Zhang Y. miRU: An automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(web server issue): W701–W704.
- [102] Kim SK, Nam JW, Rhee JK, Lee WJ, Zhang BT. Mi-Target: microRNA target-gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinform*, 2006, 7: 411. [\[DOI\]](#)
- [103] Zhang LF, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu ZJ, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genet*, 2009, 5(11): e1000716. [\[DOI\]](#)
- [104] Zeng CY, Wang WQ, Zheng Y, Chen X, Bo WP, Song SH, Zhang WX, Peng M. Conservation and divergence of microRNAs and their functions in *Euphorbiaceous* plants. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(3): 981–995. [\[DOI\]](#)
- [105] Lacombe S, Nagasaki H, Santi C, Duval D, Piégu B, Bangratz M, Breitler JC, Guiderdoni E, Brugidou C, Hirsch J, Cao XF, Brice C, Panaud O, Karlowski WM, Sato Y, Echeverria M. Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity on the genomic organisation and expression of miRNA genes in rice. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 123. [\[DOI\]](#)
- [106] Liu C, Zhang L, Sun J, Luo YZ, Wang MB, Fan YL, Wang L. A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(2): 903–909. [\[DOI\]](#)
- [107] Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol*, 2003, 13(20): 1768–1774. [\[DOI\]](#)
- [108] Reyes JL, Chua NH. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J*, 2007, 49(4): 592–606. [\[DOI\]](#)
- [109] Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotech*, 2006, 24(11): 1420–1428. [\[DOI\]](#)