

番茄中与致病密切相关 miRNA 的挖掘及特性分析

孙广鑫, 栾雨时, 崔娟娟

大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一类在真核生物体内普遍存在的、长度约 22nt 的内源性非编码小分子 RNA, 它通过与靶 mRNA 的结合参与多种基因的表达调控。番茄作为一种重要的模式植物, 其 miRNA 的研究近年来也取得了较大的进展。文章通过搜集已报道的文献和 miRBase, 找到番茄中 34 个 miRNA 的表达与致病相关, 采用生物信息学方法预测它们的靶基因, 利用 Cytoscape 软件构建 miRNA 及其靶基因的调控网络。从中筛选出 13 个与致病密切相关的 miRNA, 根据各 miRNA 之间关联性的多少及其与致病相关靶基因的多少, 进一步选出 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027, 并对其进行了靶基因功能分析、启动子分析及实时定量 PCR 验证, 为全面深入研究 miRNA 的作用机制奠定了基础。

关键词: miRNA; 番茄; 生物信息学; 靶基因; 启动子

Mining and characterization of miRNAs closely associated with the pathogenicity in tomato

Guangxin Sun, Yushi Luan, Juanjuan Cui

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small endogenously RNA with an approximate length of 22nt which are known to be ubiquitous in eukaryotes. More importantly, miRNAs are key regulators of gene expression in eukaryotic cells through the degradation of target mRNA. The investigation on miRNAs in tomato that is an important model plant has made a great progress in recent years. Herein, by collecting the reported literature and miRBase, we found that 34 miRNAs in tomato are closely associated with pathogenicity. Subsequently, we predicted their target genes through bioinformatics approaches and built a disease-related regulatory network of miRNA and its target genes using Cytoscape program. This has led us to identify 13 miRNAs that are closely associated with pathogenicity in tomato from which we selected miR169, miR482, miR5300, miR6024, miR6026 and miR6027 for further analysis based on the association between miRNAs and the number of target genes. Lastly, we performed the analysis of target gene, promoter and real time quantitative PCR verification for these 6 miRNAs. Our study may pave the way for future in-depth analysis of biological action of miRNAs.

Keywords: miRNA; tomato; bioinformatics; target gene; promoter

收稿日期: 2013-08-07; 修回日期: 2013-09-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30972001, 31272167) 资助

作者简介: 孙广鑫, 在读研究生, 专业方向: 生物化工。E-mail: sgx_here@163.com

通讯作者: 栾雨时, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 植物与微生物互作。E-mail: luanyush@dlut.edu.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.0069

网络出版时间: 2013-10-29 16:52:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20131029.1652.001.html>

MicroRNA (miRNA)普遍存在于生物体内,是由内源基因编码的长度为 22nt左右的单链非编码小分子RNA^[1],可与RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合识别其靶 mRNA。植物中miRNA序列高度保守并呈现出独特的表达时序性和组织特异性。在植物细胞核中,内源miRNA基因先形成前体转录本pri-miRNA,然后被加工形成较为稳定的初级茎环结构,再进一步形成具有发夹结构的pre-miRNA,最后经DCL1酶剪切形成miRNA/miRNA*双链复合体,从细胞核进入细胞质形成成熟的miRNA^[2],与RISC结合后作用于靶基因,发挥其翻译阻遏或者降解作用^[3]。miRNA参与植物生长发育的多种生理生化过程以及各种生物与非生物胁迫反应^[4]等。

番茄作为重要的园艺作物,不仅具有很高的经济价值,而且在生命科学研究中也占有举足轻重的地位。由于番茄具有易杂交、繁殖系数高、遗传资源丰富、突变体库较多、遗传图谱广泛、遗传转化体系高效稳定等特性,使其成为作物研究中的模式植物之一。在植物与病原物互作的研究方面,由于番茄基因组复杂且病原种类丰富,陆续得到了众多的理论信息^[5]。2009年,Feng等^[6]率先检测了与病毒相关的番茄miRNA,其后的研究表明miRNA在黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、番茄不孕病毒(Tomato aspermy virus, TAV)、番茄卷叶新德里病毒(Tomato leaf curl new delhi virus, ToLCNDV)、番茄灰霉病等病害的防御和发生中均发挥着重要的调控作用。因此,对miRNA的抗逆功能研究可为番茄种质资源改良提供一定的理论依据。

目前对miRNA的挖掘主要有直接克隆(Direct cloning)、正向遗传学(Forward genetics)筛选和生物信息学(Bioinformatics)分析等方法。直接克隆法比较简单,第一条植物miRNA就是用该方法发现的,很多实验室已经利用这种方法从不同生物中发现了众多miRNA^[7-9],该方法更倾向于发现中、高量表达的miRNA,但很难发现一些表达量低、组织特异性强或受诱导表达的miRNA。近年来,高通量测序技术的发展极大地完善了该方法,并使得大规模鉴定miRNA成为可能^[10,11],很多植物的miRNA都是通过高通量测序获得的^[12-14]。正向遗传学筛选是在获得突变个体后,将突变基因分离出来,从而得到一

个新的产物。最初的lin-4和let-7就是利用正向遗传学筛选发现的^[15,16],该方法可以清楚地了解miRNA的功能,但效率很低,只能鉴定到少量的miRNA,因此,正向遗传学筛选方法无法成为发现miRNA的主要手段,只是在miRNA研究早期使用较多。生物信息学分析方法可筛选出经各种测序方法获得的大量数据中的miRNA,它能够弥补直接克隆法的不足,发现一些丰度低、组织特异性强或受诱导表达的miRNA。随着一些物种基因组序列、大量EST(Expressed sequence tag)和GSS(Genome survey sequences)等序列的公布,也可以不通过测序,而是根据miRNA的保守性和独有的特征,利用生物信息学方法在基因组、EST和GSS中预测miRNA前体,进而找到保守的miRNA,但通过该方法获得的miRNA还需经过实验验证以确定其真实性^[17,18]。生物信息学分析方法快速、简单、高效,但是很难发现与现有miRNA无同源性的新的miRNA。

当番茄受病原物侵染时,体内的多种miRNA及相关靶基因的表达量都会发生变化,说明miRNA在番茄响应生物胁迫中发挥着关键的调控作用^[19,20]。为了筛选出番茄体内与致病密切相关的miRNA,本研究采用生物信息学手段,从Sanger miRNA数据库——miRBase(Release 20: June 2013, <http://www.mirbase.org/>)和已报道的文献中找到34个miRNA的成熟序列,预测了它们的靶基因,利用Cytoscape软件构建这些miRNA之间的调控网络,从中筛选出miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026和miR6027,进行了进一步的分析及实时定量PCR验证,为深入研究miRNAs的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野生醋栗番茄(*Solanum pimpinellifolium*)材料L3708为本实验室保藏;致病疫霉菌种P12103为西北农林科技大学单卫星教授惠赠。通过NCBI、Web of Knowledge及文献检索等途径,统计出番茄中与致病相关的miRNA共34个(表1),其中miR156、miR159、miR160、miR162、miR166、miR167、miR169、miR171、miR172、miR319、miR395、miR397、miR399、miR482、miR5300、miR6022、miR6023、miR6024、miR6026和miR6027是在miRBase中已经登录的。

利用 Primer5 软件分析设计其中 5 个 miRNA 的上游引物序列及内参基因 *Actin*(GenBank: U60478.1)的上、下游引物序列(表 2)。

1.2 方法

1.2.1 致病相关 miRNA 序列的获得及靶基因预测

从 Sanger miRNA 数据库——miRBase(<http://www.mirbase.org/search.shtml>)(release 20)和已报道的文献及其附件中收集到的 34 个 miRNA 全部家族成员的成熟序列。

将上述 miRNA 利用软件 psRNATarget ([http://](http://plantgrn.noble.org/psRNATarget)

plantgrn.noble.org/psRNATarget) 进行靶基因预测。在 *Solanum Lycopersicon*(tomato)、transcript、cDNA library version2.3 数据库中预测番茄 miRNA 的靶基因。预测参数除 Maximum expectation 设为 5.0 外,其余均使用程序默认参数。

1.2.2 致病密切相关 miRNA 的筛选

利用 Cytoscape 软件构建病原诱导的 miRNA 及其靶基因的调控网络。根据各靶基因的个数确定对应圆点的大小,从中筛选出与致病密切相关的 miRNA 作为主要的研究和分析对象。

表 1 番茄中与致病相关的 34 个 miRNA

序号	miRNA	文献来源	序号	miRNA	文献来源
1	sly-miR156	[21~24]	18	sly-miR395	[24]
2	sly-miR157	[23,24]	19	sly-miR396	[23,24]
3	sly-miR159	[21,23~31]	20	sly-miR397	[24,33]
4	sly-miR160	[21,22,24,27,31]	21	sly-miR398	[24,26]
5	sly-miR162	[21~24,28~32]	22	sly-miR399	[24,33]
6	sly-miR164	[21~24,29~33]	23	sly-miR403	[23]
7	sly-miR165	[22~24,28, 30~32]	24	sly-miR408	[24]
8	sly-miR166	[22~24,28,30~34]	25	sly-miR447	[24]
9	sly-miR167	[21~24,30~33]	26	sly-miR482	[29,34]
10	sly-miR168	[21~26,28~32,34]	27	sly-miR1918	[33]
11	sly-miR169	[22~24,31,33]	28	sly-miR2118	[34]
12	sly-miR170	[24]	29	sly-miR5300	[34]
13	sly-miR171	[21~24,26,27,29~31,33,35]	30	sly-miR6022	[36]
14	sly-miR172	[24,33]	31	sly-miR6023	[36]
15	sly-miR319	[22~28,31,32,35]	32	sly-miR6024	[36]
16	sly-miR390	[23,31]	33	sly-miR6026	[36]
17	sly-miR391	[24]	34	sly-miR6027	[36]

表 2 设计的 5 个 miRNA 的上游引物及 *Actin* 的上、下游引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
sly-miR169a-FP	ATTACAGCCAGGGATGACTTGC
sly-miR482b-FP	TCTTGCCCTACACGCCCAT
sly-miR6024-FP	CGGCTTTTAGCAAGAGTTGTTTTAC
sly-miR6026-FP	GCTTCTTGGCTAGAGTTGTATTGC
sly-miR6027-FP	GTGAATCCTTCGGCTATCCATAA
<i>Actin</i> -FP	TGTGTTGGACTCTGGTGATGGTGT
<i>Actin</i> -RP	ATCCAAACGAAGAATGGCATGCGG

1.2.3 致病密切相关 miRNA 的靶基因功能分析

根据上述靶基因预测结果,针对筛选出的若干 miRNA 的靶基因名称和 GO 注释号在 Uni-protKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>)蛋白数据库中分析各靶基因的功能。统计出与病害相关的靶基因。

1.2.4 致病密切相关 miRNA 的启动子分析

针对筛选出的若干 miRNA 的基因 5'端上游 1 500 bp 的启动子片段,利用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

在线程序进行上游启动子预测及分析。找出与病害相关的启动子元件。

1.2.5 致病密切相关 miRNA 的实时定量 PCR 验证

选取长势相同的番茄五叶期幼苗为试材, 以 10^6 个孢子/mL 的致病疫霉孢子悬浮液喷施叶片, 分别于处理后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 时取样, 用 RNAiso plus (TaKaRa, Japan) 试剂盒提取总 RNA, 再用 miRNA 反转录试剂盒 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan) 对样品中的 miRNA 进行加尾, 加上一个长为 60 bp 左右的接头, 通过实时定量 PCR 进行验证。本研究使用的各 miRNA 的上游引物见表 2, 下游引物为试剂盒中提供的通用引物 Uni-miR qPCR Primer。反应体系为 25 μ L, 包括: $2 \times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 12.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 正反向引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s; 60 $^{\circ}$ C 复性 20 s, 40 个循环。用番茄 *Actin* 作为内参基因, 荧光数据在每个循环的复性末期采集。对得到的结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析绘出柱状图, 并对实时定量 PCR 产物进行 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 致病密切相关 miRNA 的靶基因预测及筛选

整理分析 psRNATarget 在线预测出的 miRNA 及其靶基因。先构建 miRNA 与靶基因间的 Cytoscape 调控网络。发现在整个网络中有多个 miRNA 携带它的靶基因单独存在, 还有一部分 miRNA 是通过它们的靶基因与少数几个 miRNA 相关联, 而只有一部分 miRNA (miR156、miR157、miR159、miR167、miR169、miR171、miR319、miR403、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027) 是通过它们的靶基因与多个 miRNA 相关联形成了致密网络。再以这 13 个分布较集中的 miRNA 为研究对象构建得到它们相互间的 Cytoscape 调控网络 (图 1)。从图 1 可知 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027 的靶基因个数较多且与其他 miRNA 的关联性较大 (至少有 4 个相关联的 miRNA)。

2.2 致病密切相关 miRNA 的靶基因功能分析

用 psRNATarget 在线软件预测 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027 的靶基因,

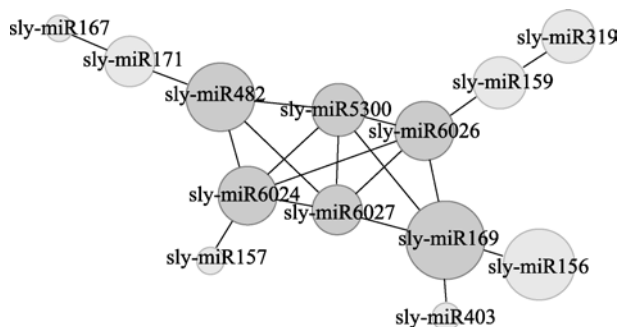


图 1 致病密切相关各 miRNA 之间的调控网络 (圆的大小与靶基因数目呈正相关)

经筛选后各获得多条靶基因。根据各靶基因的名称和 GO 注释号在 Uni-protKB 蛋白数据库中查询每条靶基因的功能, 可将它们分为 5 类: (1) 编码与胁迫响应相关的蛋白质; (2) 编码与代谢相关的酶蛋白; (3) 编码与跨膜运输相关的蛋白质; (4) 编码转录因子; (5) 未知蛋白。统计发现 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027 编码与胁迫响应相关蛋白质的靶基因分别占各自总靶基因的 22.45%、80.30%、71.43%、95.45%、59.09% 和 100.00%。可见, 预测到的靶基因大部分与番茄的胁迫响应相关, 其中有很多参与致病过程 (表 3)。

表 3 与致病密切相关的各 miRNA 的靶基因

miRNA	靶蛋白	靶基因
sly-miR169	Nbs抗性蛋白片段	Solyc12g006040.1.1
	Tir-nbs抗性蛋白片段	Solyc01g102920.2.1
sly-miR482	Tir-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc04g007320.1.1
	Nbs抗性蛋白片段	Solyc04g025820.1.1
	Cc-nbs抗性蛋白片段	Solyc04g025840.1.1
sly-miR5300	Cc-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc02g036270.2.1
	Cc-nbs抗性蛋白片段	Solyc05g008650.1.1
	Cc-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc09g018220.1.1
	Nbs抗性蛋白片段	Solyc06g064780.1.1
	Nbs-lrr抗性蛋白	Solyc06g064760.1.1
sly-miR6024	Tir-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc05g006620.2.1
	Cc-nbs抗性蛋白片段	Solyc11g065780.1.1
	Cc-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc05g008070.2.1
	Nbs抗性蛋白片段	Solyc11g070000.1.1
sly-miR6026	Nbs-lrr抗性蛋白	Solyc02g070410.1.1
	Cc-nbs抗性蛋白片段	Solyc02g070750.1.1
	Cc-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc09g092290.1.1
	Cc-nbs抗性蛋白片段	Solyc04g026110.2.1
sly-miR6027	Cc-nbs-lrr抗性蛋白	Solyc11g069020.1.1
	Nbs-lrr抗性蛋白	Solyc04g008190.1.1

2.3 致病密切相关 miRNA 的启动子分析

应用 PlantCARE 在线程序对 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027 前体基因 5'端上游 1 500 bp 的序列进行启动子预测分析。结果表明，除 miR6027 外，其他各成员的启动子区域不仅存在典型的具有转录起始功能的 TATA-box 和 CAAT-box，还存在多种胁迫相关的顺式作用元件(包括激素响应、光响应、生物胁迫响应、厌氧响应、干旱响应和温度响应元件等)以及与生物胁迫相关的启动子元件 TC-rich repeats；同时 miR169、miR482、miR5300 和 miR6026 中还存在与生物胁迫

相关的启动子元件 Box-W1。由于不能确定 miR6027 在染色体上的具体位置，所以未对其进行启动子分析。

2.4 致病密切相关 miRNA 的实时定量 PCR 验证

5 个 miRNA 的实时定量 PCR 检测结果见图 2。致病疫霉处理后，番茄叶片中的 miR169、miR482、miR6024、miR6026 和 miR6027 的表达量均在 3 h 内迅速降低，在 24 h 时普遍有所回升，在 48 h 时又降到最低点。以上结果说明这 5 个 miRNA 都能对致病疫霉处理做出响应。且通过琼脂糖凝胶电泳检测(图 3)表明，miR169、miR482、miR6024、miR6026

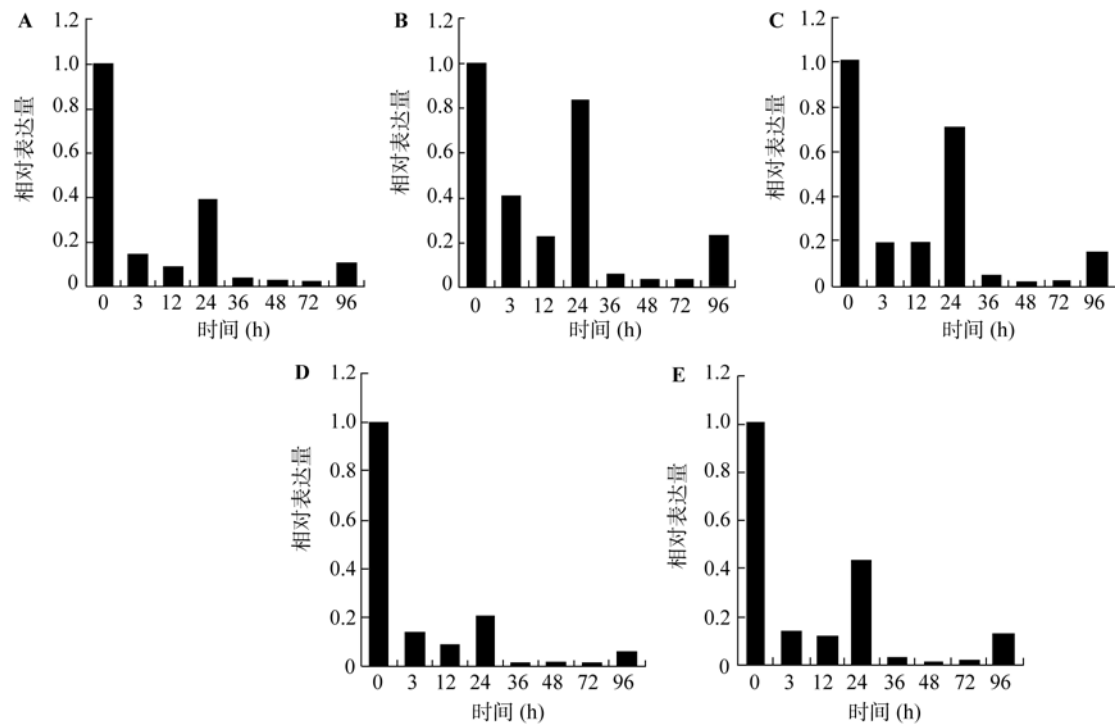


图 2 致病疫霉处理后 5 个 miRNA 的表达特性
A: miR169; B: miR482; C: miR6024; D: miR6026; E: miR6027。

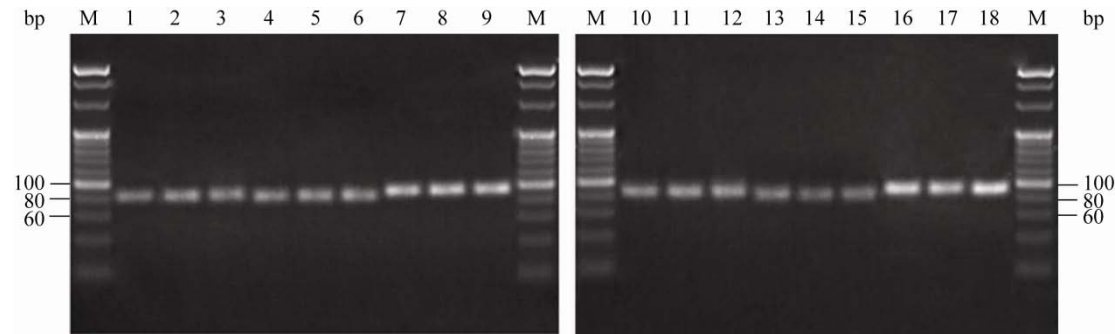


图 3 实时定量 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测
M: 20 bp DNA Ladder Marker; 1~3: miR169; 4~6: miR482; 7~9: miR6024; 10~12: miR6026; 13~15: miR6027; 16~18: Actin。

和 miR6027 的扩增产物都在 80 bp 左右,说明符合预期长度。

3 讨论

近年来,miRNA 作为基因调控因子备受瞩目,已迅速成为生命科学领域的研究热点。众所周知 miRNA 是植物对胁迫响应过程中不可或缺的调控因子,它通过互补作用靶向 mRNA 抑制或降解相应基因的表达,参与调控生物体内的各项生命活动。本研究采用生物信息学分析方法构建 Cytoscape 网络图,欲筛选与致病密切相关的 miRNA,对选出的 miR169、miR482、miR5300、miR6024、miR6026 和 miR6027 进行靶基因功能分析和启动子分析。结果发现,这 6 个 miRNA 的靶基因和启动子基本都与生物胁迫相关,表明它们极可能参与了番茄对胁迫响应的调控过程。为了探究各 miRNA 在致病疫霉处理下的表达情况,本文又对其中 5 个 miRNA 进行了表达特性分析。发现这 5 个 miRNA 的表达量都有显著变化,且趋势基本一致,均在 48 h 时降到最低水平,说明这 5 个 miRNA 都能对致病疫霉的接种做出响应,且它们之间可能存在某些相似的通路。由于 miR5300 的引物特异性不理想,所以本文未对其进行实验分析。究竟在胁迫下各 miRNA 与其靶基因存在怎样的相互关系,后者又是如何表达的,这些问题还有待于进一步的实验验证。

番茄作为重要的栽培植物,在受到真菌、细菌、病毒以及线虫和昆虫的侵害时常造成大量减产^[37],甚至绝收,给农业生产带来严重影响。研究发现,植物抗病(R)基因能够识别病原物并引起过敏反应,它作为防卫系统的一员,在没有病原物感染时表达量很低,但当病原物感染后,能够识别激发子,诱导抗病基因的过量表达,并激活抗病信号传导途径,产生防卫反应^[38],从而提高作物对病害的抗性。所以,克隆抗性基因将对研究植物和病原物互作、提高植物抗病性具有重要意义。近年来已从不同植物中克隆出了各种R基因。多数R基因具有NBS-LRR结构域,其中NBS(Nucleotide binding site)是抗病基因核苷酸结合位点。而NBS-LRR编码基因是抗病基因中的最大家族,大约 3/4 的抗病基因都来自于这一家族。根据N端信号肽的不同,又将NBS-LRR基因分为 TIR-NBS-LRR和CC-NBS-LRR两类^[39,40]。这些

抗病基因大量存在于植物基因组中,它的作用对象囊括了所有病原物^[41]。经靶基因功能分析发现筛选出的 6 个 miRNA 的靶基因中均含有 NBS-LRR 抗性蛋白,推测植物在受到病原物感染时,这 6 个 miRNA 的表达量也会发生相应的变化,从而说明了我们筛选的 miRNA 的确是致病密切相关的。并且已有实验证明,当番茄植株受到 CMV、TAV、Tolcv 和灰霉病菌感染时,用基因芯片技术检测到 miR169 表达量逐渐上调,而其靶基因的表达量下调,说明 miR169 参与了病原物的胁迫响应。miR482、miR6024、miR6026 和 miR6027 也被预测到参与植物的免疫应答过程,靶向植物的免疫受体^[24]。

由于启动子控制着基因表达的起始时间和表达程度,而某些 miRNA 的表达又具有时空特异性和组织特异性。所以,对启动子的研究将成为 miRNA 表达特性分析的重要工具^[42]。研究发现,大部分 miRNA 都含有独立的启动子,是 RNA 聚合酶 II 的产物^[43],经过转录而形成。所以,它的表达很有可能受到精确的调控。为进一步剖析 miRNA 在胁迫下的表达模式,本研究利用 PlantCARE^[44]对番茄 miR169、miR482、miR5300、miR6024 和 miR6026 基因上游启动子区域进行分析,发现在这些区域中存在共同的植物病原物感染和损伤响应顺式作用元件 TC-rich repeats 和 Box-W1。表明这些生物胁迫相关 miRNA 可能参与了相应的逆境胁迫过程,也暗示植物在响应生物胁迫时可能存在某些共同的通路。研究发现 Box-W1 存在于如萜合成酶(STS)和病程相关蛋白 PR-1、Ypr-10 中^[45,46],位于多病原体感染和非生物胁迫响应基因 VvALDH2B8 的启动子区域,能特异的结合 WRKY 转录因子^[47],参与胁迫响应基因的表达调控。所以,这些胁迫响应顺式元件的存在为 miRNA 参与植物抗逆反应提供了证据。此外,番茄作为一种模式植物,挖掘和分析其与病害相关的 miRNA 还有助于揭示植物与病原物互作的分子机制。

参考文献

- [1] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338. [\[DOI\]](#)
- [2] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006,

- 57: 19–53. [\[DOI\]](#)
- [3] 金龙国, 王川, 刘进元. 植物MicroRNA. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(8): 609–614. [\[DOI\]](#)
- [4] Kulcheski FR, De Oliveira LFV, Molina LG, Almerão MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GAG, Margis R. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 307. [\[DOI\]](#)
- [5] Arie T, Teraoka T, Takahashi H, Kodama M. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 2007, 24(1): 135–147. [\[DOI\]](#)
- [6] Feng JL, Wang K, Liu X, Chen SN, Chen JS. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene*, 2009, 437(1–2): 14–21. [\[DOI\]](#)
- [7] Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1397–1411. [\[DOI\]](#)
- [8] Tang GL, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 49–63. [\[DOI\]](#)
- [9] Llave C, Xie ZX, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of *Scarecrow-like* mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053–2056. [\[DOI\]](#)
- [10] Lu C, Tej SS, Luo SJ, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 2005, 309(5740): 1567–1569. [\[DOI\]](#)
- [11] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(S1): D731–D735. [\[DOI\]](#)
- [12] Zhao CZ, Xia H, Frazier TP, Yao YY, Bi YP, Li AQ, Li MJ, Li CS, Zhang BH, Wang XJ. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 3. [\[DOI\]](#)
- [13] Li BS, Qin YR, Duan H, Yin WL, Xia XL. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. *J Exp Bot*, 2011, 62(11): 3765–3779. [\[DOI\]](#)
- [14] Zhou ZS, Zeng HQ, Liu ZP, Yang ZM. Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(1): 86–89. [\[DOI\]](#)
- [15] 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. [\[DOI\]](#)
- [16] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906. [\[DOI\]](#)
- [17] 张志明, 宋锐, 彭华, 罗茂, 沈亚欧, 刘丽, 赵茂俊, 潘光堂. 用生物信息学挖掘玉米中的microRNAs及其靶基因. 作物学报, 2010, 36(8): 1324–1335. [\[DOI\]](#)
- [18] Zhang JG, Zeng R, Chen JS, Liu X, Liao QS. Identification of conserved microRNAs and their targets from *Solanum lycopersicum* Mill. *Gene*, 2008, 423(1): 1–7. [\[DOI\]](#)
- [19] Feng JL, Lai LY, Lin RH, Jin CZ, Chen JS. Differential effects of *cucumber mosaic virus* satellite RNAs in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 775–784. [\[DOI\]](#)
- [20] Diermann N, Matousek J, Junge M, Riesner D, Steger G. Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol Chem*, 2010, 391(12): 1379–1390. [\[DOI\]](#)
- [21] Feng JL, Lin RH, Chen JS. Alteration of tomato microRNAs expression during fruit development upon *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* infection. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3713–3722. [\[DOI\]](#)
- [22] Feng JL, Lai LY, Lin RH, Jin CZ, Chen JS. Differential effects of *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 775–784. [\[DOI\]](#)
- [23] Feng JL, Liu X, Lai LY, Chen JS. Spatio-temporal expression of miRNAs in tomato tissues upon *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* infections. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(4): 258–266. [\[DOI\]](#)
- [24] Naqvi AR, Haq QMR, Mukherjee SK. MicroRNA profiling of *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) infected tomato leaves indicates that deregulation of miR159/319 and miR172 might be linked with leaf curl disease. *Virus J*, 2010, 7(1): 281. [\[DOI\]](#)
- [25] Vu TV, Choudhury NR, Mukherjee SK. Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, show tolerance to virus infection. *Virus Res*, 2013, 172(1–2): 35–45. [\[DOI\]](#)
- [26] Várallyay E, Válczy A, Ágyi A, Burgyn J, Havelda Z. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J*,

- 2010, 29(20): 3507–3519. [\[DOI\]](#)
- [27] Stav R, Hendelman A, Buxdorf K, Arazi T. Transgenic expression of *Tomato bushy stunt virus* silencing suppressor P19 via the pOp/LhG4 transactivation system induces viral-like symptoms in tomato. *Virus Genes*, 2010, 40(1): 119–129. [\[DOI\]](#)
- [28] Martín R, Arenas C, Daròs JA, Covarrubias A, Reyes JL, Chua NH. Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in infected tomato plants. *Virology*, 2007, 367(1): 135–146. [\[DOI\]](#)
- [29] Pilcher RLR, Moxon S, Pakseresht N, Moulton V, Manning K, Seymour G, Dalmay T. Identification of novel small RNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 2007, 226(3): 709–717. [\[DOI\]](#)
- [30] Feng JL, Wang K, Liu X, Chen SN, Chen JS. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene*, 2009, 437(1–2): 14–21. [\[DOI\]](#)
- [31] Feng JL, Wang YW, Lin RH, Chen JS. Altered expression of microRNAs and target mRNAs in tomato root and stem tissues upon different viral infection. *J Phytopathol*, 2013, 161(2): 107–119. [\[DOI\]](#)
- [32] Cillo F, Mascia T, Pasciuto MM, Gallitelli D. Differential effects of mild and severe *Cucumber mosaic virus* strains in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato map to the 3' sequence of RNA 2. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22(10): 1239–1249. [\[DOI\]](#)
- [33] Naqvi AR, Choudhury NR, Mukherjee SK, Haq QMR. *In silico* analysis reveals that several tomato microRNA/microRNA* sequences exhibit propensity to bind to *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) associated genomes and most of their encoded open reading frames (ORFs). *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(1): 13–17. [\[DOI\]](#)
- [34] Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, Bond DM, Santos BACM, Baulcombe DC. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site–leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 859–874. [\[DOI\]](#)
- [35] Goswami S, Sahana N, Pandey V, Doblas P, Jain RK, Palukaitis P, Canto T, Praveen S. Interference in plant defense and development by non-structural protein NSs of *Groundnut bud necrosis virus*. *Virus Res*, 2012, 163(1): 368–373. [\[DOI\]](#)
- [36] Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(5): 1790–1795. [\[DOI\]](#)
- [37] van Kan JAL. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(5): 247–253. [\[DOI\]](#)
- [38] Thureau T, Kifle S, Jung C, Cai DG. The promoter of the nematode resistance gene Hs1^{pro-1} activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(3): 643–660. [\[DOI\]](#)
- [39] Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 2001, 411(6839): 826–833. [\[DOI\]](#)
- [40] van Der Biezen EA, Jones JDG. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol*, 1998, 8(7): R226–R227. [\[DOI\]](#)
- [41] He LM, Du CG, Covaleta L, Xu ZY, Robinson AF, Yu JZ, Kohel RJ, Zhang HB. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LRR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17(11): 1234–1241. [\[DOI\]](#)
- [42] 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. [\[DOI\]](#)
- [43] Johnston RJ Jr, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, 426(6968): 845–849. [\[DOI\]](#)
- [44] Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, van de Peer Y, Rouz P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325–327. [\[DOI\]](#)
- [45] Pühlinger H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Machado MLD. The promoter of an apple *Ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci*, 2000, 152(1): 35–50. [\[DOI\]](#)
- [46] Pape S, Thurow C, Gatz C. The *Arabidopsis PR-1* promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNI1. *Plant Physiol*, 2010, 154(4): 1805–1818. [\[DOI\]](#)
- [47] Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J*, 1996, 15(20): 5690–5700. [\[DOI\]](#)