

植物miRNA的研究方法概述

易小娅, 杨瑞瑞, 曾幼玲*

新疆大学生命科学与技术学院新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐830046

摘要: microRNA (miRNA)是动植物中广泛存在的内源性非编码小RNA分子, 通过与靶基因mRNA的特定位置结合, 在转录后水平负调控靶标基因的表达。植物miRNA几乎调控所有的生物学和代谢过程, 包括生长发育、细胞维持和分化、信号转导以及对逆境胁迫的响应。随着第二代深度测序技术和生物信息学的快速发展, miRNA的相关研究已从模式植物扩展到非模式植物, 发现了大量新的miRNA, 并确定了小部分miRNA的生物学功能。由于miRNA序列短小, 与靶标基因作用的不确定以及调控网络的复杂性, 研究难度较大。本文从研究方法的角度对miRNA的鉴定、靶基因的验证和miRNA功能研究等方面所涉及的方法进行总结, 试图为植物miRNA的研究提供一些思路和启发。

关键词: 植物miRNA; 靶基因; 研究方法

Overview of Research Methods for Plant miRNAs

YI Xiao-Ya, YANG Rui-Rui, ZENG You-Ling*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are an extensive class of small non-protein-coding endogenous RNA in animals and plants, which negatively regulate gene expression at the post-transcription levels by degrading mRNA or repressing mRNA translation, depending on the complementarities between a miRNA and its targeted mRNAs. Plant miRNAs play an important role in almost all biological and metabolic processes, including growth and development, cell maintenance and differentiation, signal transduction and response to environmental stresses. With the rapid development of next generation deep sequencing and advanced bioinformatics, the miRNA-related study has been expanded to non-model plant species. A number of miRNAs have been identified and the biological functions of a part miRNAs have also been confirmed in the past years. Nevertheless, we know it is difficult to study on miRNAs because of their short sequences, the uncertain interaction with target genes and the complex of the regulatory network. This paper reviews the research methods for plant miRNAs including miRNA identification, target validation and functional study as well. It is very significant to provide some ideas and inspiration for scientific researchers engaging in plant small RNAs.

Key words: plant miRNAs; target genes; research method

microRNA (miRNA)是一类大小约21~24 nt, 在转录后水平调控基因表达的内源性RNA分子, 一般来源于染色体的非编码区域, 成熟的miRNA由一段具有颈环二级结构的单链RNA经过剪切而成, 在物种之间相对保守, 在表达上具有明显的组织和时间特异性(Bartel 2004; Jones-Rhoades和Bartel 2004)。在植物的生长发育及各种生物和非生物胁迫反应过程中, miRNA发挥着重要作用, 参与叶形态和花器官的发育(Liu等2011; Kim等2005)及盐、干旱、水分和病原菌等胁迫(Jia等2009; Kantar等2010; Pradhan等2015; Ren等2012)。Zhou等(2013)将水稻(*Oryza sativa*) *miR319*转入匍匐翦股颖(*Agrostis stolonifera*)中, 导致植株叶片蜡质含量

增加、保水性提高、Na⁺的摄取减少、转基因植株的耐旱和耐盐性明显增强。Hewezi等(2012)将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *miR396*过表达后, 发现转基因植株中*miR396*大量表达, 根细胞重新编程, 合胞体的大小减小, 线虫发育畸形, 植物具备了对线虫的抗性, 这种调控方式为提高植物抗寄生虫的危害开辟了新途径。

近年来, 随着更多的miRNA被发现以及它们

收稿 2014-12-15 修定 2015-03-09

资助 国家“973”计划前期研究专项(2012CB722204)、国家自然科学基金(31160186)和自治区高校科研计划项目(XJED-U2011102)。

* 通讯作者(E-mail: zeng_ylxju@126.com; Tel: 0991-8582076)。

的靶基因和生物学功能的鉴定, miRNA介导的基因表达调控已经成为新的研究热点。在对miRNA的研究中, 鉴定组织细胞内miRNA的种类是认识miRNA的首要问题。随着第二代深度测序技术的普及, 从最初的直接克隆到生物信息学的介入, 保守及新的miRNA的寻找与克隆的问题得到了极大的改善(Zhang和Wang 2015)。鉴定miRNA的靶基因是目前认识miRNA生物学功能的重点与难点, 计算机辅助预测和试验验证是最常用的研究技术; 随着越来越多的miRNA被鉴定和获得, miRNA生物学功能的研究迫在眉睫, 许多miRNA的功能是从过表达miRNA的转基因植株或者同义突变miRNA靶基因功能突变体中确定的(Zhou等2013; Song等2013); 此外, 人工miRNA (artificial miRNA, amiRNA)技术作为一种高特异性、高通量的沉默技术也得到了较好的应用(de la Luz Gutierrez-Nava等2008)。

如何寻找新的miRNA, 验证miRNA与靶基因的靶向关系以及miRNA生物学功能的研究都是众多科研工作者关注的热点, 而如何将这部分联系起来, 组建一套较为清晰全面的研究思路还有待探讨。基于此, 我们将从miRNA的寻找与鉴定、靶基因的验证及生物学功能研究3个方面介绍植物miRNA的研究方法。

1 植物miRNA的获取方法

1.1 直接克隆

由于miRNA在细胞中大量存在, 分子克隆可以直接指向miRNA。一般采用TRIzol等试剂从植物组织中获取总RNA, 经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳回收15~26 nt的小RNA分子, 或采用植物miRNA分离纯化试剂盒, 对小RNA进行富集, 通过5'和3'加接头反转录产生小RNA的cDNA文库, 经PCR反应后将扩增产物构建上克隆载体并对其测序。将测序结果与该物种已知基因组、转录组等数据库信息BLAST (basic local alignment search tool), 排除编码基因和核糖体RNA (ribosomal RNA, rRNA), 转移RNA (transfer RNA, tRNA)以及核小RNA (small nuclear RNA)等非miRNA序列, 通过Northern blot等方法最终确认miRNA。Sunkar和Zhu (2004)为了鉴定受非生物胁迫诱导的未知miRNA, 对拟南芥进行干旱、盐、冷的胁迫或

ABA的施加, 将各个处理下的拟南芥分别构建小RNA文库, 进行测序及分析, 鉴定了26个新的miRNA, 组成15个新的miRNA家族, 并对这些克隆获得的新miRNA通过Northern blot对野生型和突变株拟南芥进行了表达分析, 发现miRNA可能与植物抵抗非生物胁迫密切相关。用同样的方法, He等(2008)从芸薹(*Brassica rapa*)中克隆了9个保守的miRNA家族和3个潜在的未知miRNA, 通过表达分析, 发现有些保守的芸薹miRNA与拟南芥具有不同的组织表达特性。

1.2 生物信息学

由于真核生物组织中有些miRNA的丰度较低, 而且其表达具有组织和时序特异性, 采用直接克隆方法发现新的miRNA较为困难。根据miRNA前体和成熟体都具有显著的结构特征, 采用生物信息学方法寻找未知miRNA是当前发现和鉴定miRNA的重要策略之一。为了区别miRNA与其他小RNA, miRNA的预测必须遵循以下原则: (1) RNA序列可折叠成合适的颈环二级结构; (2)成熟体序列在颈环结构的一条臂上; (3) miRNA与另一条臂上的互补序列miRNA*少于6个碱基错配; (4) miRNA*序列不能成环, 与成熟体序列比对时不能有间断; (5)二级结构有较高负的最小折叠自由能(negative minimal free energy, MFE)和最小折叠自由能指数(minimal free energy index, MFEI), A+U碱基含量为30%~70%; (6)成熟体序列与已报道的miRNA少于4个碱基替换(Zhang等2006; Ambros等2003)。miRNA的预测流程如图1所示(Zhang等2008)。

Zhang等(2008)从已知miRNA数据库中下载了863条miRNA序列作为同源搜索的参考信息, 包括前体和成熟体序列, 与番茄(*Solanum lycopersicum*)表达序列标签(expressed sequence tag, EST)、基因组序列(genome survey sequence, GSS)、普通核酸(CoreNucleotide)和细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)等数据库中共578 503条核苷酸序列进行同源比对, 预测了13个miRNA的前体序列, 并克隆了其中6个, 为了验证预测结果的准确性, 根据已报道的另外9个物种中的294条成熟体miRNA序列设计特异性探针引物, 通过微流体芯片技术(microfluidic microarray)在番茄叶

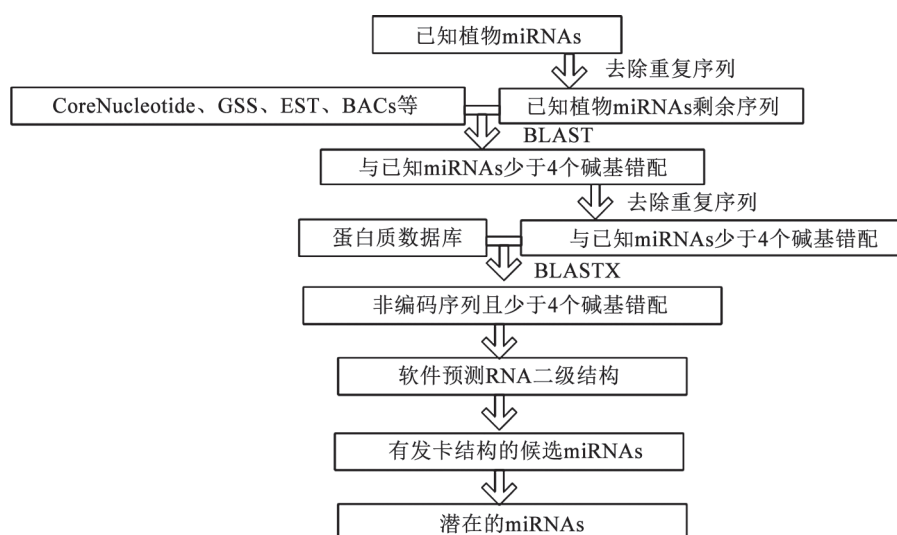


图1 同源搜索鉴定植物miRNAs的流程

Fig.1 Procedure of plant miRNAs identification with homology search

片组织中鉴定了258条成熟体miRNA序列, 这些miRNA分布在92个miRNA家族中, 完全包揽了之前通过同源搜索鉴定的miRNA前体序列。Niu等(2013)用同样的方法对具有基因组背景的‘Suli’梨(*Pyrus pyrifolia*)进行了miRNA的鉴定, 获得了属于37个家族的186个保守miRNA; 并用软件TAPIR (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/tapir/>)预测了靶基因; 通过基因本体论数据库(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对靶基因进行了分类和功能分析。

1.3 深度测序

DNA测序作为一种重要的实验技术, 在生物学研究中有着广泛的应用。然而随着科学研究和技术平台的发展, 一种费用更低、通量更高、速度更快的第二代测序技术(next generation sequencing)应运而生。现有的技术平台主要包括Roche/454 FLX、Illumina/Solexa Genome Analyzer和Applied Biosystems Solid System。虽然直接克隆和同源搜索都可以获得miRNA, 但是第二代深度测序的出现迅速取代了上述两种技术。相较于传统克隆的方法, 深度测序具有覆盖面广、信息量大和可直接检测miRNA表达水平等无可比拟的优势。

miRNA的表达水平会随环境变化而改变,

Baev等(2014)为了检测拟南芥在高、低温下小RNA的丰度及表达水平, 分别建立了两个小RNA文库, 深度测序的结果表明低温胁迫的处理主要富集21 nt的miRNA, 高温下主要为21~24 nt的miRNA。

盐芥(*Thellungiella salsuginea*)作为一种有望成为研究耐盐性的盐生模式植物, 鉴定盐胁迫下的miRNA具有重要意义。Zhang等(2013)以200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫处理24 h及未经胁迫处理的盐芥为材料, 分别构建了两个小RNA文库, 通过Solexa测序, 鉴定了109个保守miRNA, 137个新的miRNA及26个miRNA*; 依托盐芥的基因组信息, 预测了143个先前报道过的靶基因及425个盐芥特有miRNA的靶基因。通过RNA连接酶介导的5' cDNA末端快速扩增(RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA end, 5' RLM-RACE)验证了7个靶基因的靶位点。

miRNA作为一类转录后调控因子, 与植物的生长发育和响应环境胁迫密切相关。为了探究miRNA在杨树(*Populus alba* × *P. glandulosa*)冬眠激活生长下的表达水平, Ding等(2014)构建了3个小RNA文库, 分别是短日照诱导休眠、低温诱导的外生性休眠以及长日照诱导的生长激活, 通过Illumina高通量测序, 获得了具有显著差异表达的123个已知miRNA, 275个新的miRNA, 其中34个

miRNA丰度较高且具有独特的表达模式。

有报道称暗形态建成发育是幼苗抵御黑暗胁迫的重要机制,受miRNA调控。为了在基因组水平鉴定芸薹幼苗的miRNA,通过Solexa对黑暗胁迫4 d的芸薹幼苗进行了测序,获得了属于36个家族的96个保守miRNA和576个新的miRNA;此外,qRT-PCR检测黑暗处理下miRNA的表达趋势与测序结果一致。预测了2 013个潜在的靶基因,并通过5' RLM-RACE验证了miR157、miR159和miR160对靶基因的切割(Zhou等2014)。

植物的生长与所处环境中的微生物关系密切,Thiebaut等(2014)为了了解玉米(*Zea mays*)小RNA与内生固氮菌的关系,对玉米进行了固氮菌的接种,并进行了深度测序,获得了25个保守的miRNA和15个新的miRNA,发现玉米与有益内生固氮菌相互作用时, RNA介导的沉默机制会触发特殊的胁迫响应。

为了探究miRNA在甜橙(*Citrus sinensis*)生长发育中扮演的角色, Liu等(2014)通过高通量测序从叶、花和果实不同组织中进行了基因组水平的比较,鉴定了183个已知miRNA和38个新的miR-

NA,并通过qRT-PCR和Northern blot分析比较了不同组织和发育阶段miRNA的表达模式。

作为重要粮食作物的鹰嘴豆(*Cicer arietinum*),虽然已有了全基因组测序背景,但其miRNA的研究却知之甚少。Jain等(2014)对鹰嘴豆的7个主要组织和器官进行了小RNA的Illumina深度测序,通过与其他植物中获得的已知miRNA同源比对,鉴定了440个保守的miRNA和178个新的miRNA,发现部分鹰嘴豆miRNA具有明显的时空和组织特异表达,同一家族中不同成员具有保守和特异表达的模式。

以上3种植物miRNA鉴定方法各有利弊,相较于其他几种方法,深度测序以鉴定数量最多、高效、不需基因组信息、无需试验验证、发现新的miRNA及在各个物种中应用广泛等特征明显优于其他选择。但是由于一次深度测序可以产生大量数据,需要生物信息学的后续分析,否则很难从冗杂的数据资源中获得重要信息,因此,将生物信息学分析和实验方法紧密结合将极大地促进miRNA的鉴定(Zhang和Wang 2015)。表1中列出了利用二代测序技术鉴定部分植物的miRNA。

表1 利用二代测序技术鉴定植物miRNAs

Table1 Identification of plant miRNAs by next generation deep sequencing

物种	处理条件或不同组织	miRNA的种类和数量	参考文献
拟南芥	高温和低温胁迫	118个保守miRNA	Baev等2014
盐芥	盐胁迫	109个保守miRNA, 137个新的miRNA及26个miRNA*	Zhang等2013
杨树	冷诱导的冬眠解除	123个已知miRNA, 275个新miRNA	Ding等2014
芸薹	黑暗胁迫	96个保守miRNA, 576个新的miRNA	Zhou等2014
玉米	内生固氮菌胁迫	25个保守的miRNA, 15个新的miRNA	Thiebaut等2014
甜橙	组织特异性	183个保守miRNA, 38个新的miRNA	Liu等2014
鹰嘴豆	组织特异性	440个保守的miRNA, 178个新的miRNA	Jain等2014

2 靶基因的预测与验证

miRNA不能直接调控植物的生长和发育,所有的miRNA几乎都是通过靶向编码蛋白的基因实现调控功能,所以评估miRNA功能的第一步也是最重要的一步就是靶基因的验证,以下将从生物信息学预测和生物学实验验证两方面进行综述。

2.1 生物信息学预测

成熟miRNA通过碱基配对与其靶基因结合从而造成靶基因切割、阻遏翻译以及甲基化等负调控效应,这些原则可以总结如下: (1) miRNA与靶

基因序列互补配对,少于4个碱基错配,其中10和11位不能有错配,2~12位少于1个碱基错配,13位下游少于2个碱基错配; (2) miRNA结合靶基因自由能至少为与靶基因完全互补配对的72% (Schwab等2005)。根据这些原则,研究者设计了多种算法对靶基因进行辅助预测。虽然有大量miRNA-target预测规则和程序,但大多数都是根据动物miRNA设计的,相较于植物miRNA靶基因的预测,动物miRNA对于碱基互补的完全性较宽松,并且动物miRNA倾向于对靶基因的翻译抑制,而植物

miRNA选择对靶基因进行切割。此外,动物miRNA通常结合在靶基因的3'非翻译区,而植物miRNA通常没有特定位置的喜好(Ekimler和Sahin

2014)。这些差异导致了植物miRNA需要特有的预测工具,以下将对目前最常用的几个预测软件及工具进行介绍(表2)。

表2 植物miRNA作用的靶基因预测的常用生物信息学资源

Table 2 A brief summary of bioinformatics tools for plant miRNA target identification

运算法则	网址	预测指标	输入数据	参考文献
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	种子区域匹配度、靶位点保守性	miRNA序列、基因序列	Barozai等2012
psRNATarget	http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/	种子区域匹配度、靶位点保守性、自由能、靶点依赖性	miRNA序列、基因序列	Dai和Zhao 2011
miRdeepFinder	http://www.leonxie.com/DeepFinder.php	种子区域匹配度、靶位点保守性	miRNA序列、基因序列	Xie等2012
C-mii	http://www.biotech.or.th/isl/c-mii	种子区域匹配度、靶位点保守性、自由能	miRNA序列、基因序列	Numnark等2012
CleaveLand	http://axtell-lab-psu.weebly.com/cleaveland.html	种子区域匹配度、靶位点保守性、自由能、靶点依赖性、切割位点频率	降解组数据库、小RNA和mRNA数据库序列	Addo-Quaye等2009

BLAST是一种序列快速比对的工具,根据以上原则,可对靶基因进行快速而直接的预测。Barozai等(2012)为了预测向日葵(*Helianthus annuus*) miRNA的靶基因,将获得的miRNA序列与向日葵基因组数据库进行高度相似比对,选择得分在75%以上的序列,再结合生物信息学软件RNA-hybrid (Krüger和Rehmsmeier 2006)进行预测,获得了61个新miRNA的84个靶基因。Tian等(2014)将盐胁迫下获得的花椰菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)保守和新的miRNA与ESTs进行比对,分别预测了836和527个靶基因。

psRNATarget是用于鉴定植物小RNA靶基因的程序软件,能够高效地分析二代深度测序获得的数据,整合了以下2个重要的功能:(1)根据得分模式评价miRNA与靶基因转录本反向互补程度;(2)通过计算小RNA与靶基因mRNA形成的二级结构的自由能评价靶位点的近似性(Dai和Zhao 2011)。psRNATarget已经广泛用于多种物种的miRNA研究,Kohli等(2014)为了探索鹰嘴豆miRNA在应对真菌感染和盐胁迫中发挥的作用,通过二代测序技术获得了来自25个不同家族的122个保守miRNA,59个新的miRNA,利用psRNATarget预测了约358个不同的靶基因。同样的方法在油菜(*Brassica napus*) (Shen等2014)、大豆(*Gly-*

cine max) (Guo等2014)、小米(*Setaria italica*) (Han等2014)、凤梨(*Vriesea carinata*) (Guzman等2013)中也进行了应用。

miRdeepFinder是植物小RNA深度测序的另一个分析软件,包含了前体加工的原始数据,具有鉴定保守miRNA、挖掘新的miRNA并进行分类、miRNA表达水平分析、靶基因预测和miRNA与靶基因作用网络分析等综合内容。miRdeepFinder的分析不受物种的限制,也不受基因组信息的限制(Xie等2012)。

C-mii是第一款具有图示详解操作流程的靶基因预测软件,具有安装方便、有图像指示操作、预测结果可做成图表和分组信息的鸟瞰图、可校正和自动化恢复以及多项目多线程管理等优点,尤其适合没有生物信息学平台的中小型植物分子实验室(Numnark等2012)。

CleaveLand可用于分析降解组数据,检测miRNA的靶基因切割位点。输入降解组数据、小RNA和mRNA数据库,即可获得小RNA的靶基因,可用于任何物种的降解组数据,且同样适合miRNA以外的其他小RNA的分析(Addo-Quaye等2009)。

虽然生物信息学预测方法多种多样,但是依据不同原则预测的不同方法得到的结果往往不能

完全一致, 所以调整生物信息学工具, 获得更为精确的预测结果与实验验证一样重要(Ekimler和Sahin 2014)。

2.2 生物学实验方法验证

通过生物信息学预测的靶基因存在一定的假阳性, miRNA是否可以靶向切割或抑制靶基因的

表3 miRNA可能作用的靶基因检测实验技术

Table 3 Experimental validation of miRNA targets

实验技术	原理	物种	处理条件或不同组织	参考文献
5' RLM-RACE	直接检测miRNA切割位点	豇豆	盐胁迫	Paul等2011
降解组测序	直接检测miRNA切割位点	黄瓜	组织特异性	Mao等2012
qRT-PCR	RNA水平检测miRNA与靶基因的表达量	棉花	铅胁迫	He等2014
烟草瞬时表达体系	蛋白质水平检测靶基因的表达量	小麦	病原菌胁迫	Feng等2014a
CLIP、HITS-CLIP、PAR-CLIP	miRNA-AGO-mRNA复合体	人类		Wen等2011; Licatalosi等2008; Hafner等2010

表达最终仍需要采用生物学实验进行验证(表3)。

2.2.1 5' RLM-RACE

虽然有研究报道, miRNA可以通过靶向切割、翻译抑制、甲基化与去甲基化等途径调节功能基因的表达, 但植物miRNA仍以切割为最主要的作用方式(Jung等2009)。依据此特点可采用5' RLM-RACE方法, 检测miRNA的切割位点。先用RNA连接酶在mRNA的5'端加上一个RNA接头进行反转录, 再用接头特异引物与基因特异引物进行PCR扩增, 克隆测序鉴定切割位点, 在切割位点处会呈现异常高的克隆频次, 以此来确定miRNA的切割位点。Paul等(2011)在鉴定盐胁迫下豇豆(*Vigna unguiculata*) miRNA的研究中, 使用5' RLM-RACE技术成功证明了miR160对ARF的切割作用。

2.2.2 降解组测序

与5' RLM-RACE原理相似并且同样常用的另一种技术是平行末端分析(parallel analysis of RNA end, PARE), 也被称为降解组测序(degradome sequencing)。PARE技术与5' RLM-RACE不同的是, PARE技术富集所有含poly(A)的mRNA, 并且在RNA接头上有一个内切酶Mme识别位点, 该内切酶切割位点位于其识别位点下游20 bp处, 加接头的mRNA反转录成cDNA, 用Mme酶切后加上一个DNA接头, 根据两侧接头的序列设计引物, 经PCR扩增后克隆建库进行深度测序, 测序后得到20 bp的序列, 然后通过生物信息学与原mRNA转录本进行序列比对。与5' RLM-RACE相同的是, PARE无法检测通过翻译抑制靶基因表达的miRNA (Feng

等2014b; Pantaleo等2010)。

Mao等(2012)结合高通量测序和降解组测序揭示了黄瓜(*Cucumis sativus*) miRNA与靶基因的组织特异性表达, 经CleaveLand 2.0分析后, 鉴定出11个已知miRNA的21个靶基因, 这些miRNA包括miR156/157、miR159、miR164、miR167和miR169等。Zhang等(2012)通过降解组测序, 鉴定了枸橼(*Poncirus trifoliata*)新的miRNA与保守miRNA的149和172个靶基因, GO和KEGG注释表明这些靶基因与植物的生长代谢紧密相关。

2.2.3 qRT-PCR

miRNA调控的最终结果是靶基因表达量降低, 因此通过qRT-PCR检测靶基因在转录水平的表达量来寻找靶基因是最常用的鉴定方法。

He等(2014)为了检测miRNA介导的重金属胁迫响应, 对棉花(*Gossypium hirsutum*)进行了不同浓度的铅胁迫, 通过qRT-PCR对16个胁迫响应miRNA和10个靶基因进行了表达模式的检测, 结果显示大部分miRNA与靶基因的表达呈现负相关, 还有部分miRNA与靶基因表现为正相关。而与之相似的, Wang等(2013)对棉花进行了盐和干旱胁迫, 并用qRT-PCR检测了miRNA与靶基因在胁迫下的表达模式, 结果发现miRNA与靶基因的表达具有浓度和组织依赖性, 在7个miRNA-target组合中有5组存在显著相关性。

2.2.4 构建烟草(*Nicotiana tabacum*)瞬时表达体系

构建烟草瞬时表达体系观察报告基因蛋白的表达强弱可以得到更可靠、形象的实验证据。最

常用的方法是利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)基因*GFP*、葡糖苷酸酶(β -glucuronidase)基因*GUS*等作为指示标记来检测miRNA对靶基因的降解作用。其做法是将miRNA的靶基因序列片段融合报告基因构建至植物表达载体,将构建好的克隆载体和miRNA同时导入烟草,报告基因在启动子驱动下转录表达。如果miRNA能作用于靶基因序列,转录本被切割降解,将检测不到报告基因的表达或表达减弱;反之,如果miRNA不能作用于靶基因序列,则会检测到报告基因的表达(Gao等2011)。

Feng等(2014a)在研究成年小麦(*Triticum aestivum*)抵抗条锈病的研究中,通过降解组测序得到2个新的miRNA,命名为1136-P3和PN-2013,并预测了其靶基因——单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase)基因*TaMDHAR*,构建烟草瞬时表达体系共转miRNA与靶基因,发现相较于只转入融合有*GUS*的靶基因,报告基因*GUS*的蛋白表达显著降低,且酶活下降,证明了这2个miRNA对靶基因的靶向作用。

2.2.5 miRNA-AGO-mRNA复合体

miRNA与AGO (argonaute)蛋白结合并招募其他蛋白形成RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),通过序列互补对靶基因进行序列切割或阻遏(Bartel 2004),因此是否形成miRNA-AGO-mRNA复合体是miRNA与靶基因相互作用的重要依据。据此将AGO蛋白与抗原相连,用免疫共沉淀(crosslinking immunoprecipitation, CLIP)分离得到miRNA-AGO-mRNA的复合体,以此来富集与miRNA相互作用的mRNA序列,然后通过微阵列深度测序等方法获取miRNA靶基因信息或作用位点序列(Wen等2011)。与此类方法类似的有高通量紫外交联免疫沉淀法(high-throughput sequencing of RNAs isolated by crosslinking immunoprecipitation, HITS-CLIP)(Licatalosi等2008)和光激活核酸加强交联免疫共沉淀法(photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, PAR-CLIP)(Hafner等2010)。但是目前这些方法主要用于动物miRNA的靶基因鉴定,植物中暂时未见报道。

上述实验验证方法各有优缺点,大多数研究者都会选择联合使用其中2~3种技术对miRNA可

能作用的靶基因进行验证。

3 植物miRNA功能研究与应用

大量研究表明,miRNA参与植物的生长发育以及逆境响应的多种生物学过程,虽然已从众多植物中克隆鉴定了miRNA,并验证了部分miRNA作用的靶基因,但仍有许多miRNA的生物学功能有待破译。

3.1 miRNA过表达

有研究报道,通过遗传学的方法过表达单个miRNA,获得的转基因植株能够增强或减弱对生物或非生物胁迫的耐性。植物miRNA的生物合成经历了初级转录产物(primary miRNA, pri-miRNA)、前体miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA)和miRNA成熟体几个阶段。由于pre-miRNA独特的颈环结构包含了形成miRNA成熟体的完整序列,可确保其在细胞内被加工为正确无误的miRNA成熟体序列,因此,用强启动子驱动pre-miRNA的转录是目前miRNA过表达体系中最广泛的方法,对于未知前体序列的miRNA则不能直接用此方法进行转基因功能研究。Xia等(2012)过表达水稻*OsmiR393*,降低了靶基因*OsTIR1*和*OsAFB2*的表达,转基因水稻出现更多分蘖并提早开花,降低了水稻的盐和旱耐性,这可能是因为miR393通过降低2个生长素受体基因*TIR1*和*AFB2*的表达导致对生长素信号通路的高敏感。

3.2 同义突变或功能缺失靶基因

由于miRNA序列短小,miRNA家族由多个成员组成,有部分功能重叠,所以传统的遗传突变并不适合miRNA的研究,通过靶基因同义突变miRNA切割位点碱基或功能缺失,利用转基因技术,可以间接研究miRNA的功能(Mallory等2004)。

拟南芥*miR394*的表达受到ABA诱导,靶基因*LCR* (*leaf curling responsiveness*)在ABA的处理下表达量减少。过表达*miR394*和*lcr*突变体均表现出盐敏感性和抗寒性增强,过表达同义突变靶基因*m5LCR*则出现耐盐性增强和抗寒性降低,过表达*miR394*使拟南芥对ABA敏感,而靶基因的同义突变体则表现相反。结果证明了miR394通过抑制靶基因*LCR*是维持植物响应非生物胁迫的重要途径。这种应对盐和寒冷胁迫截然相反的表现可能是miR394和*LCR*之间的平衡失调导致的。当这种平衡失调,植株就会表现为ABA超敏感或者ABA

抗性, miR394通过靶向切割LCR的途径使植物更好地应对ABA和非生物胁迫(Song等2013)。

3.3 miRNA target mimicry (TM)

miRNA功能研究最理想的方法是缺失或抑制miRNA的表达, miRNA TM通过特异性地结合指定miRNA, 在序列中间成环而阻断miRNA对靶基因的调控作用(Franco-Zorrilla等2007)。Bazin等(2013)通过构建豆科植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) miR396 TM, 阻断miRNA对靶基因的切割作用, 导致靶基因的表达明显升高, 进而促进了植物菌根的生长; 而过表达miR396则导致靶基因的表达量减少, 抑制植物菌根的生长, 从而证明了miR396对蒺藜苜蓿菌根分裂组织的影响。

Sorin等(2014)为了鉴定miR169对拟南芥根结构生成的影响, 构建了不同的miR169 TM, 改变了根分生组织特异细胞形态的数量和大小, 通过阻断miR169对靶基因核转录因子Y中A亚基(nuclear factor Y-A, NF-YA)的调控, 间接影响了侧根的发育。

3.4 amiRNA

amiRNA是将天然miRNA的成熟序列替换成人工设计的靶向其他感兴趣基因的反义序列, 通过天然miRNA的生成和作用途径达到RNA干扰(RNA interference, RNAi)的效果(Alvarez 2006)。

Niu等(2006)以拟南芥miR159前体为骨架, 构建了靶向两个可以编码沉默病毒mRNA的序列, 这两个靶基因为P69和HC-Pro, 将amiR-P69¹⁵⁹和amiR-HC-Pro¹⁵⁹转入拟南芥中成功获得了特异性抵抗芜菁黄花叶病毒(turnip yellow mosaic virus, TYMV)和芜菁花叶病毒(turnip mosaic virus, TuMV)的转基因植株。

Park等(2009)在构建amiRNA时发现, 与amiRNA*在5'端有碱基错配, 与靶基因完全互补配对的amiRNA具有极高的基因沉默效率, 获得了API (APETALLA1)无义突变的转基因拟南芥; 此外, 通过应用amiRNA多聚体形式可以同时沉默2个独立的基因API和CALI (CAULIFLOWER)。

3.5 人工反式作用干扰小RNA (artificial trans-acting small interfering RNA, ata-siRNA)

在植物体内有一种反式作用干扰小RNA (trans-acting small interfering RNA, ta-siRNA), 其成熟过程由miRNA介导, 随后产生21 nt的双链RNA (dou-

ble-stranded RNA, dsRNA)对靶基因进行切割, 是细胞主动利用RNAi机制进行的防御, 由Peragine等(2004)在研究*rdr6* (RNA-DEPENDENT POLYMERASE6)和*sgs3* (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3)突变体对拟南芥生长的影响时首先发现。ata-siRNA就是根据这种机制设计的新的miRNA功能研究方法。以miR173为例, 其触发基因为*TAS1a* (trans-acting siRNA1a), 构建的ata-siRNA包含2个转录本, 分别是miR173和*TAS1a*, 都具有独立的启动子和终止子, 在转录过程中, 靠近5'端的miR173转录加工形成miR173成熟体, 结合*TAS1a*转录本5'端的miR173触发序列上, 这种结合将会导致*TAS1a*被剪切成许多21 nt的ata-siRNA, 它们均可人为设计成miRNA或siRNA, 每个ata-siRNA再结合到内源性的靶基因转录本上, 导致靶基因的切割或翻译抑制(Zhang 2014)。

以上miRNA的功能研究方法各有利弊, 所以在对某一种miRNA进行功能研究时, 往往结合多种研究方法在体内和体外同时进行才能更好地鉴定miRNA的功能。

4 展望

作为一类新发现的基因表达调控因子, 植物miRNA参与众多的生物学过程, 包括生长发育、代谢及响应环境中的生物和非生物胁迫, 对其研究成为生命科学的热点。近年来, 植物miRNA的研究发展迅速, 从小规模的提取分离小RNA进行直接克隆, 到现在大规模的二代深度测序鉴定新的植物miRNA, miRNA的鉴定已经相对容易。深度测序的发展必将带来大量的数据信息, 这促进了生物信息学的发展; 然而, 不同的软件对植物miRNA靶向关系预测计算规则各有不同, 往往导致预测结果不一致, 所以采用统一标准进行靶基因的预测很有必要, 如何服务众多中小型植物分子实验室, 建立生物信息学分析平台也具有重大意义。此外, 由于大量植物没有基因组信息, miRNA前体的研究进展较慢, 来自不同的miRNA前体却可以产生相同成熟体的机制有待揭秘, 前体在miRNA行使功能中存在何种生物学意义还不明确。Feng等(2014a)在研究小麦*TaMDHAR*与新发现的miRNA PN-2013、1136-P3的关系时, 利用*GUS*作为报告基因证明了这2个miRNA均可减弱

靶基因的表达,然而在后续的qRT-PCR分析表达规律时发现, *TaMDHAR*与PN-2013呈现出负相关,却并不受1136-P3的调控,这让人思索,植物miRNA通过切割靶基因进行调控是主要的机制还是因为这种方式比抑制蛋白翻译更容易被检测到,体外实验的证明结果能否表示植物体内miRNA真实的调控方式(Zhang和Wang 2015)。虽然面临很多待研究的问题,但随着基因组、转录组、蛋白组和降解组等组学技术的发展,结合生物信息学和多种实验方法,miRNA的研究将更具针对性且更深入。

参考文献

- Addo-Quaye C, Miller W, Axtell MJ (2009). CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets. *Bioinformatics*, 25 (1): 130~131
- Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 18 (5): 1134~1151
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M et al (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9 (3): 277~279
- Baev V, Milev I, Naydenov M, Vachev T, Apostolova E, Mehterov N, Gozmanva M, Minkov G, Sablok G, Yahubyan G (2014). Insight into small RNA abundance and expression in high- and low-temperature stress response using deep sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Bioch*, 84: 105~114
- Barozai MYK, Baloch IA, Din M (2012). Identification of microRNAs and their targets in *Helianthus*. *Mol Biol Rep*, 39 (3): 2523~2532
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116 (2): 281~297
- Bazin J, Khan GA, Combiere J, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R, Sorin C, Palatnik J, Hartmann C, Crespi M et al (2013). miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 74 (6): 920~934
- Dai X, Zhao PX (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res*, 39: W155~W159
- de la Luz Gutierrez-Nava M, Aukerman MJ, Sakai H, Tingey SV, Williams RW (2008). Artificial *trans*-acting siRNAs confer consistent and effective gene silencing. *Plant Physiol*, 147 (2): 543~551
- Ding Q, Zeng J, He XQ (2014). Deep sequencing on a genome-wide scale reveals diverse stage-specific microRNAs in cambium during dormancy-release induced by chilling in poplar. *BMC Plant Biol*, 14 (1): 267~282
- Ekimler S, Sahin K (2014). Computational methods for microRNA target prediction. *Genes*, 5 (3): 671~683
- Feng H, Wang XJ, Zhang Q, Fu YP, Feng CX, Wang B, Huang LL, Kang ZS (2014a). Monodehydroascorbate reductase gene, regulated by the wheat PN-2013 miRNA, contributes to adult wheat plant resistance to stripe rust through ROS metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1839 (1): 1~12
- Feng JL, Liu SS, Wang MN, Lang QL, Jin CZ (2014b). Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with *Cucumber mosaic virus* based on deep sequencing. *Planta*, 240 (6): 1335~1352
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia JA, Paz-Ares J (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of miRNA activity. *Nat Genet*, 39 (8): 1033~1037
- Gao P, Bai X, Yang L, Lv DK, Pan X, Li Y, Cai H, Ji W, Chen Q, Zhu YM (2011). *osa-MIR393*: a salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. *Mol Biol Rep*, 38 (1): 237~242
- Guo N, Ye WW, Yan Q, Huang J, Wu YR, Shen DY, Gai JY, Dou DL, Xing H (2014). Computational identification of novel microRNAs and targets in *Glycine max*. *Mol Biol Rep*, 41 (8): 4965~4975
- Guzman F, Almerão MP, Korbes AP, Christoff AP, Zanella CM, Bered F, Margis R (2013). Identification of potential miRNAs and their targets in *Vriesea carinata* (Poales, Bromeliaceae). *Plant Sci*, 210: 214~223
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp A, Munschauer M et al (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141 (1): 129~141
- Han J, Xie H, Sun QP, Wang J, Lu M, Wang WX, Guo EH, Pan JB (2014). Bioinformatic identification and experimental validation of miRNAs from foxtail millet (*Setaria italica*). *Gene*, 546 (2): 367~377
- He QL, Zhu SJ, Zhang BH (2014). MicroRNA-target gene responses to lead-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Funct Integr Genomic*, 14 (3): 507~515
- He XF, Fang YY, Feng L, Guo HS (2008). Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class *R* gene-derived novel miRNA in *Brassica*. *FEBS Lett*, 582 (16): 2445~2452
- Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ (2012). The *Arabidopsis* microRNA396-*GRF1/GRF3* regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiol*, 159 (1): 321~335
- Jain M, Chevala VN, Garg R (2014). Genome-wide discovery and differential regulation of conserved and novel microRNAs in chickpea via deep sequencing. *J Exp Bot*, 65 (20): 5945~5958
- Jia XY, Wang WX, Ren LG, Chen QJ, Mendu V, Willcut B, Dinkins R, Tang XQ, Tang GL (2009). Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 71 (1~2): 51~59
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14 (6): 787~799
- Jung JH, Seo PJ, Park CM (2009). MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnol Rep*, 3 (2): 111~126
- Kantar M, Unver T, Budak H (2010). Regulation of barley miRNAs

- upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Funct Integr Genomic*, 10 (4): 493–507
- Kim J, Jung JH, Reyes JL, Kim YS, Kim SY, Chung KS, Kim JA, Lee M, Lee Y, Narry KV et al (2005). microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J*, 42 (1): 84–94
- Kohli D, Joshi G, Deokar AA, Bhardwaj AR, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Srinivasan R, Jain PK (2014). Identification and characterization of wilt and salt stress-responsive microRNAs in chickpea through high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 9 (10): e108851
- Krüger J, Rehmsmeier M (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res*, 34: W451–W454
- Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, Ule J, Kayikei M, Chi SW, Clark TA, Schweitzer AC, Blume JE, Wang XN et al (2008). HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*, 456 (7221): 464–469
- Liu YL, Wang L, Chen DJ, Wu XM, Huang D, Chen LL, Li L, Deng XX, Xu Q (2014). Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. *BMC Genomics*, 15: 695–709
- Liu ZY, Jia LG, Wang H, He YK (2011). HYL1 regulates the balance between adaxial and abaxial identity for leaf flattening via miRNA-mediated pathways. *J Exp Bot*, 62 (12): 4367–4381
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 14 (12): 1035–1046
- Mao WH, Li ZY, Xia XJ, Li YD, Yu JQ (2012). A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. *PLoS ONE*, 7 (3): e33040
- Niu QF, Qian MJ, Liu GQ, Yang FX, Teng YW (2013). A genome-wide identification and characterization of microRNAs and their targets in ‘Suli’ pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group). *Planta*, 238 (6): 1095–1112
- Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol*, 24 (11): 1420–1428
- Numnark S, Mhuantong W, Ingsriswang S, Wichadakul D (2012). C-mii: a tool for plant miRNA and target identification. *BMC Genomics*, 13 (Suppl 7): S16–S25
- Pantaleo V, Szittyá G, Moxon S, Miozzi L, Moulton V, Dalmay T, Burgyan J (2010). Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Plant J*, 62 (6): 960–976
- Park W, Zhai JX, Lee JY (2009). Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting *API* or heteromeric artificial miRNA targeting *API* and *CAL* genes. *Plant Cell Rep*, 28 (3): 469–480
- Pal S, Kundu A, Pal A (2011). Identification and validation of conserved microRNAs along with their differential expression in roots of *Vigna unguiculata* grown under salt stress. *Plant Cell Tiss Org*, 105 (2): 233–242
- Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS (2004). *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 18 (19): 2368–2379
- Pradhan B, Naqvi AR, Saraf S, Mukherjee SK, Dey N (2015). Prediction and characterization of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) responsive novel microRNAs in *Solanum lycopersicum*. *Virus Res*, 195: 183–195
- Ren YY, Chen L, Zhang YY, Kang XY, Zhang ZY, Wang YW (2012). Identification of novel and conserved *Populus tomentosa* microRNA as components of a response to water stress. *Funct Integr Genomic*, 12 (2): 327–339
- Schwab R, Palatnik JF, Rieger M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*, 8 (4): 517–527
- Shen D, Suhrkamp I, Wang Y, Liu SY, Menkhaus J, Verreet JA, Fan LJ, Cai DG (2014). Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using *Brassica* AA (*Brassica rapa*) and CC (*Brassica oleracea*) as reference genomes. *New Phytol*, 204 (3): 577–594
- Song JB, Gao S, Sun D, Li H, Shu XX, Yang ZM (2013). miR394 and LCR are involved in *Arabidopsis* salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biol*, 13: 210–225
- Sorin C, Declerck M, Christ A, Blein T, Ma L, Lelandais-Brière C, Njo MF, Beeckman T, Crespi M, Hartmann C (2014). A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 202 (4): 1197–1211
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (8): 2001–2019
- Thiebaut F, Rojas CA, Grativol C, Motta MR, Vieira T, Regulski M, Martienssen RA, Farinelli L, Hemerly AS, Ferreira PC (2014). Genome-wide identification of microRNA and siRNA responsive to endophytic beneficial diazotrophic bacteria in maize. *BMC Genomics*, 15: 766–783
- Tian YH, Tian YM, Luo XJ, Zhou T, Huang ZP, Liu Y, Qiu YH, Hou B, Sun D, Deng HY et al (2014). Identification and characterization of microRNAs related to salt stress in broccoli, using high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Plant Biol*, 14: 226–238
- Wang M, Wang QL, Zhang BH (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530 (1): 26–32
- Wen JY, Parker BJ, Jacobsen A, Krogh A (2011). MicroRNA transfection and AGO-bound CLIP-seq data sets reveal distinct determinants of miRNA action. *RNA*, 17 (5): 820–834
- Xia KF, Wang R, Ou XJ, Fang ZM, Tian CG, Duan J, Wang YQ, Zhang MY (2012). *OsTIR1* and *OsAFB2* downregulation via *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in Rice. *PLoS ONE*, 7 (1):

e30039

- Xie FL, Xiao P, Chen DL, Xu L, Zhang BH (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Bio*, 80 (1): 75~84
- Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Mol Life Sci*, 63 (2): 246~254
- Zhang BH, Wang QL (2015). MicroRNA-based biotechnology for plant improvement. *J Cell Physiol*, 230 (1): 1~15
- Zhang JG, Zeng R, Chen JS, Liu X, Liao QS (2008). Identification of conserved microRNAs and their targets from *Solanum lycopersicum* Mill. *Gene*, 423 (1): 1~7
- Zhang JZ, Ai XY, Guo WW, Peng SA, Deng XX, Hu CG (2012). Identification of miRNAs and their target genes using deep sequencing and degradome analysis in trifoliolate orange [*Poncirus trifoliolate* (L.) Raf]. *Mol Biotechnol*, 51 (1): 44~57
- Zhang Q, Zhao CZ, Li M, Sun W, Liu Y, Xia H, Sun MN, Li AQ, Li CS, Zhao SZ et al (2013). Genome-wide identification of *Thellungiella salsuginea* microRNAs with putative roles in the salt stress response. *BMC Plant Biol*, 13 (1): 180~192
- Zhang ZYJ (2014). Artificial *trans*-acting small interfering RNA: a tool for plant biology study and crop improvements. *Planta*, 239 (6): 1139~1146
- Zhou B, Fan PZ, Li YH (2014). High-throughput sequence analysis of small RNAs in skotomorphogenic seedlings of *Brassica rapa* ssp. *rapa*. *Gene*, 548 (1): 68~74
- Zhou M, Li D, Li Z, Hu Q, Yang CH, Zhu LH, Luo H (2013). Constitutive expression of a *miR319* gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiol*, 161 (3): 1375~1391