

植物 miRNA 在非生物逆境下调控机制的研究进展

张世华¹, 上官明珠², 盛亮², 韦朝领^{2*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: MicroRNA(miRNA)是一类内源性的、长度约 18~24 nt、非编码、单链小 RNA 分子, miRNA 广泛存在于各种动植物体内, 并参与基因表达的调控。随着植物 miRNA 研究的不断发展, 越来越多的 miRNA 被证实不同的非生物逆境下具有重要的调控作用, 例如营养胁迫、低温胁迫、机械胁迫等。该文综述了植物 miRNA 的合成、miRNA 及其靶基因的鉴定方法, 并重点介绍了非生物逆境相关 miRNA 的表达分析方法、逆境条件下 miRNA 的调控特征及其靶基因特点等。

关键词: 植物; microRNA; 非生物逆境; 调控机制

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2013)04-0673-05

Research progress of plant miRNA regulatory mechanisms under the condition of abiotic stresses

ZHANG Shi-hua¹, SHANGGUAN Ming-zhu², SHENG Liang², WEI Chao-ling²

(1. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, small (~18-24 nt), single-stranded, non-coding RNAs that widely distribute in animals and plants and participate in the regulation of gene expression. With the development of the research of plant miRNA, more and more miRNAs was convinced to play important regulatory roles in the condition of abiotic stresses, e.g., nutrition starvation, low temperature, mechanism damage and so on. This paper reviews the synthesis of miRNA, the identification of miRNA and the targeted gene, and introduce the express analysis of stress-related miRNA, the regulatory pattern of miRNA and the property of the targeted gene.

Key words: plant; microRNA; abiotic stress; regulatory mechanisms

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性的、非编码、单链小 RNA 分子, 其长度约 18~24 nt。miRNA 广泛存在于动植物体内, 在植物的生长发育、器官形成、信号传导以及逆境应答等过程中具有重要的调控作用^[1]。研究发现, 植物 miRNA 在不同的非生物逆境下例如营养缺乏、低温、机械损伤等条件下具有重要的调控作用。本文综述了植物 miRNA 的合成、miRNA 及其靶基因的鉴定, 并重点介绍了非生物逆境相关 miRNA 的表达分析方法、逆境条件下 miRNA 的调控特征及其靶基因特点等方面。

1 植物 miRNA 的合成

植物 miRNA 首先在核内通过一种类似 Dicer 酶的物质 (Dicer-like, DCL1), 协同 HYL1 蛋白作用加工形成初级转录本 (primary transcripts, pri-miRNAs), pri-miRNAs 被 DCL1 剪切形成约 60~300 nt 的具有发卡茎环结构前体 (pre-miRNAs)^[2]。具有茎环结构的前体经过裂解处理, 形成 miRNA/miRNA* 双链二聚体, 经 HYL1 蛋白甲基化修饰后通过 HASTY 蛋白 (HST) 转运到细胞质中。随后在细胞质中由解旋酶 (helicase) 解开, 形成成

收稿日期: 2013-05-10

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2013M531498) 和国家自然科学基金 (31171608) 共同资助。

作者简介: 张世华, 男, 博士, 讲师。E-mail: zhangshihua@ahau.edu.cn

* 通信作者: 韦朝领, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: weichl@ahau.edu.cn

成熟的单链 miRNA。成熟的单链 miRNA 与 AGO (ARGONAUTE) 蛋白结合, 形成一种 RISC 复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)^[3]。RISC 复合体可以与靶 mRNA 结合, 剪切 mRNA 或抑制其翻译。由于植物 miRNA 与其靶基互补性很高, 而结合位点通常出现在编码区内, 从而导致靶基因断裂, 而由于不完全互补导致没有断裂的靶基因, 翻译却受到了阻碍。植物 miRNA 正是通过对靶基因的裂解或抑制基因的转录本翻译而参与基因表达的调控, 从而对植物的生长发育、逆境胁迫等过程中起到关键的调控作用^[4]。

植物 miRNA 由于其靶基因种类的不同而具有功能多样性, 研究表明, miRNA 在植物发育过程中扮演着重要的角色。植物的生长通常会遭遇不利环境因素的影响, 例如干旱、盐碱、低温、病虫害、机械损伤等。植物 miRNA 根据环境因素的变化, 对基因表达进行调控, 从而产生一系列生理生化改变, 从而对不利的环境因素做出正确的应答^[5]。

2 miRNA 的发现和鉴定

2.1 克隆

植物 miRNA 的发现源自于模式植物拟南芥。2002 年, Reinhart 通过克隆拟南芥中的小 RNA 发现了 16 个植物 miRNAs^[4]。克隆是简单直接的 miRNA 鉴定方法。通过 miRNA 克隆可以识别一些保守的 miRNA 以及物种特异的 miRNAs。Sunkar 和 Zhu 通过从非生物逆境处理的拟南芥中直接克隆出了 15 个家族的 26 个新 miRNAs, 其中有多数 miRNAs 在逆境下出现上调或下调的表达模式^[7]。Sunkar 和 Girke 在水稻中克隆出 35 个 miRNAs, 其中 14 个 miRNAs 来自 13 个新 miRNA 家族中的成员, 有 13 个新 miRNAs 在拟南芥中不保守, 4 个新 miRNA 在单子叶植物呈现一定的保守性, 说明 miRNA 伴随着植物进化出现了分歧^[8]。Sanan 和 Kumar 从经过高盐处理的水稻中克隆出 23 个 miRNAs, 发现了 6 个与盐胁迫相关的 miRNAs^[9]。然而克隆鉴别方法对于低丰度、碱基构成特殊以及组织特异性表达的 miRNAs 难于鉴定, 存在着一定的局限性。

2.2 高通量测序

高通量测序作为新一代测序技术, 由于获得片段短且具有速度快、成本低等特点, 适合发掘植物中新的 miRNAs。采用高通量测序, 不需要基因序列, 能直接对样本进行测序, 完成 miRNA 定性和定量测定。目前常用的 miRNA 测序平台主要有

454, Solid 和 Solexa, 能检测出百万级高质量的小 RNA 序列, 鉴别大量的 miRNAs。Chen 等利用高通量测序, 鉴定了杨树低温胁迫下应答的 miRNAs, 其中有 29 个未报道, 21 个在低温下表达量变低^[10]。Wang 等人通过对干旱处理的蒺藜苜蓿进行高通量测序, 鉴定了 293 个已知的 miRNAs 和 14 个新的 miRNAs, 其中 37 个 miRNA 对干旱胁迫应答^[11]。

2.3 生物信息学预测

生物信息学方法是根据 miRNA 序列信息、保守性及其前体都有二级发卡结构特点进行预测, 并依赖于物种的基因组或转录组信息。利用计算机预测植物 miRNA, 可以鉴别新的 miRNA。目前常用的生物信息学预测软件有 miRcheck、miRseeker、miRscan 等, 这些软件都以 miRNA 共有的特点进行预测, 但方法各不相同。目前, 大量预测软件被成功开发, 并且已经在拟南芥、水稻、蒺藜苜蓿等植物中准确预测出大量 miRNAs, 通过生物信息学预测筛选 miRNA, 可以有效节约大量繁琐的克隆鉴定工作, 但这种方法无法探索物种特异的 miRNA, 获得的 miRNA 需经生物学的进一步验证。

3 miRNA 靶基因的研究分析

3.1 miRNA 靶基因的预测

对 miRNA 靶基因进行预测是 miRNA 功能研究的基础, 现阶段, 可以通过生物信息学预测、miRNA 序列分析和基因功能注释 (Gene ontology, GO) 等方法对 miRNA 靶基因进行预测^[12]。

由于 miRNA 与靶基因间的相互作用具有规律性, 由此可以对 miRNA 的靶基因进行预测分析。常用的 miRNA 靶基因预测软件有: CleaveLand、Targetfinder、RNAhybrid、PicTar、TargetScan、miRanda 和 AgriGO 等。AgriGO 软件可以对已知 miRNA 进行基因功能注释分析, 预测 miRNA 靶基因重要的生物学功能及其作用途径, 绘制的层级树形图可以清晰显示 miRNA 靶基因的功能及分类。Zhang 等利用基因功能注释方法分析了玉米的所有 miRNA 靶基因^[13]。Joung 等利用模式识别方法 (support vector machine, SVM) 通过对基因表达谱和序列信息的分析成功预测并鉴定拟南芥中几个特殊环境诱导的 miRNA 靶基因^[14]。

3.2 靶基因的验证

预测的靶基因是否准确一般都要进行生物学验证, 常用的验证方法有: 剪切产物 5'RACE 法和荧光素酶法。由于植物 miRNA 主要通过裂解靶基因的方式进行基因调控, 利用 5'RACE 对 miRNA 裂

解的产物进行分析、验证 miRNA 靶基因是非常可靠的方法,能够准确发现 miRNA 对其靶基因的剪切特性以及准确的剪切位点,但也存在实验操作复杂等缺陷。荧光素酶法不但可以用于验证 miRNA 的靶基因,而且也可用于新的 miRNA 靶基因的检测,其原理为构建荧光素酶载体将 miRNA 靶基因导入,通过转染检测 miRNA 和靶基因的表达情况,从而对 miRNA 是否调控目的基因进行验证。

3.3 降解组测序

降解组测序 (degradome sequencing) 是一种广义的转录组实验方法,主要针对 miRNA 介导的剪切降解片段进行测序,筛选 miRNA 作用的靶基因,确定降解片段与 miRNA 精确的配对信息^[15]。降解组测序的原理是:绝大多数植物 miRNA 与目的 mRNA 完全互补,通过裂解 mRNA 调控基因的表达,裂解位置一般发生在 miRNA 5'端匹配区域的第 10 和第 11 位点上。靶基因裂解后产生 2 个片段,其中 5'端含有 5'帽子结构的完整基因,无法被 RNA 酶连接;3'片段含有能被 RNA 酶连接自由的 5'单磷酸和 3'polyA 尾巴,将 3'裂解产物连上接头引物后可以测序分析。通过测序数据的对比分析,可以得到 miRNA 剪切位点,发现并量化被 miRNA 剪切的靶基因^[16]。Pantaleo 利用降解组测序鉴定出葡萄已知 miRNA 的 112 个靶基因及物种特异 miRNA 的 44 个靶基因^[17]。Zhou 对水稻中 87 个 miRNA 进行降解组测序得到 177 个靶向的基因,其中约 70% 保守的 miRNA 其靶基因为转录因子,说明这些 miRNA 在水稻中扮演着重要的调控角色,而非保守的 miRNA 作用于潜在的基因,为更加复杂的调控做准备^[18]。

4 非生物逆境相关 miRNA 的表达分析法

4.1 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR (qRT-PCR) 通过 PCR 产物的荧光信号及拷贝数对 miRNA 进行准确的检测和定量分析,可用于检测植物 miRNA 在非生物逆境胁迫中的表达变化。

利用 qRT-PCR 可以检测前体 miRNA 和成熟 miRNA 的表达状况。前体 miRNA 有茎环结构,在茎环结构上设计引物,反转录后进行 qRT-PCR。而成熟 miRNA 长度很短,只有 18~24 个核苷酸,并且没有 mRNA 3'端的 poly(A)尾巴,因此无法用普通的反转录和 qRT-PCR 进行检测。目前,miRNA 的反转录主要采用加尾反转录法和茎环反转录法。加尾反转录法则是利用 poly(A)聚合酶为成熟的

miRNA 加上 poly(A)尾巴,然后用锚定引物进行反转录,获得加长 cDNA 的第一链。最后使用与通用标签序列互补的反向引物对 miRNA 表达进行荧光定量 PCR 检测。这种可以批量将所有成熟 miRNA 加上 poly(A)尾巴,然后进行反转录和检测。茎环反转录法利用可以折叠成茎环结构的引物,通过与 miRNA 的 3'端碱基互补进行反转录,生成 cDNA 第一链,进行荧光定量 PCR 检测,该方法是将反转录引物设计成茎环结构,所以特异性和灵敏性较高,可以有效区分只相差几个碱基的同家族 miRNA 的不同成员,茎环反转录法对引物的要求较高,需要引物在反转录阶段形成茎环式的正确构型。

4.2 Northern blot

Northern blot 是一种探针杂交检测法,可以用来反映植物逆境应答反应中 miRNA 的表达变化,但其特异性和灵敏度不高,所以 Northern blot 一般需要的总 RNA 样较多。目前,Northern blot 检测方法能利用锚定核苷酸(Locked nucleotide acid, LNA)修饰的寡核苷酸设计探针,并用于成熟 miRNA 的检测,有较强的特异性和灵敏性^[19]。

4.3 miRNA 芯片

miRNA 芯片 (microarray)是固定在固体基片上大量与 miRNA 序列互补的探针组成的微阵列,可以同时加入多个样本 RNA,杂交后对信号进行检测,反映 miRNA 的表达情况^[20]。芯片技术具有高灵敏性,高通量,重复性好,适合检测 miRNA 的表达谱。miRNA 芯片被广泛应用于植物 miRNA 不同发育时期、不同组织器官、不同逆境胁迫下表达水平的差异。由于需要依据 miRNA 序列设计出芯片探针,miRNA 芯片只能对已知 miRNA 的表达水平进行检测。Liu 等对拟南芥进行 miRNA 芯片分析,鉴别出 miR168、miR171 和 miR396 对高盐,干旱和冷胁迫均有诱导表达^[21]。

5 参与非生物逆境调控的 miRNA 及其特征

植物在生长发育过程中,很多环境因素例如水、营养素、光照、温度是不可或缺的,然而,环境因素的过高或过低会影响植物的生长,称为非生物逆境。有些环境因素例如土壤的高盐性、pH 值的高或低、重金属污染以及大气污染都会影响植物的生长发育。miRNA 在植物应答环境胁迫的复杂机制中起到了重要的调控作用。植物许多逆境应答反应正是通过诱导或抑制相应 miRNA 的表达,miRNA 通过剪切靶基因或者降低靶基因的翻译来抑制相关靶基因的表达,从而使植物适应不同程度的逆境胁迫。

5.1 目前已研究的非生物逆境诱导的 miRNA

目前,植物非生物逆境胁迫下 miRNA 参与调控的研究受到人们的广泛关注。Sunkar 等人构建了拟南芥脱落酸、干旱、盐碱、低温胁迫的小 RNA 文库,利用 Northern blot 方法分析发现 miR319c、miR393、miR395、miR397b 和 miR402 在盐碱、干旱和低温胁迫下均有应答反应^[22]。Buhtz 和 Pieritz 利用 miRNA 芯片在油菜中发现营养素和微量元素缺失诱导了数个 miRNA 的表达。miR398、miR408、miR2111 在 Cu 元素缺失时,表现为表达上调,而在 Fe 元素缺失表现出表达下调^[23]。

Zhou 等利用高通量测序及 miRNA 芯片研究了重金属(Hg)对蒺藜苜蓿 miRNA 表达的影响,发现许多与汞胁迫相关的 miRNA,并且表达模式具有不一致的特点^[24]。Lu 和 Sun 在毛果杨树中克隆了 22 个 miRNAs,其中一部分 miRNAs 的表达水平受拉伸和挤压的影响^[8]。

5.2 参与非生物逆境调控的 miRNA 特征

有些 miRNA 是保守的,有些 miRNA 则具有物种特异性。大部分保守 miRNA 参与植物的生长和发育,而很多物种特异的 miRNA 参与了非生物逆境胁迫应答的调控。有些保守的或者非保守的 miRNA 对不同逆境胁迫的反应表现出一致性,如水稻中的 miR156 在重金属 (Al, Cd) 胁迫、冷胁迫和干旱胁迫下出现了表达下调^[25-28];低氧、低温、高盐和强紫外光胁迫能诱导拟南芥 miR159 的表达^[21, 29-30],说明他们能够参与多种调控,而且属于非特异性的调控。

植物 miRNA 在不同器官中的表现不完全相同。Zeng 等研究了大豆根部 miRNA 和叶的 miRNA 在低磷胁迫下的表达变化,其中有 27 个叶部 miRNA 和 14 个根部 miRNA 的表达发生变化,有 9 个 miRNA 在叶部和根部表达变化一致,而 miR168 和 miR319 在叶部表现为上调,在根部表现则为抑制。有些 miRNA 在不同的物种中面对一些逆境胁迫表现出差异^[31]。拟南芥 miR399 在低磷胁迫下,会出现明显诱导表达^[32-33];而在其它作物中则不会^[34]。烟草中 miR167 在干旱胁迫下表达量上调^[35],而玉米中 miR167 在干旱下表达量下降^[36]。大部分同一家族的 miRNA 成员在逆境胁迫中表达变化趋势一样,有些变化较小,还有些不产生应答反应^[37]。

6 参与非生物逆境调控 miRNA 靶基因特点

miRNA 通过剪切或者抑制翻译来调控靶基因的表达,这依据其与靶基因序列的互补程度,

miRNA 靶基因的数目可能是一个或者多个,有些靶基因受到多个 miRNA 的调控。参与非生物逆境调控的 miRNA,其靶基因主要参与转录调控和非生物逆境应答。例如,miR398 的靶基因是超氧化物歧化酶 (CSD1 和 CSD2),在铜或铁元素缺乏的情况下,Cu/Zn-SOD 的表达受到抑制^[38]。F-box 蛋白受 miR393、miR394、miR528 的调控^[39]。miR395 受低硫胁迫的诱导,调控 3 个三磷酸腺苷硫酸化酶基因 (APS1/3/4) 的表达^[40]。转录因子在植物适应非生物逆境胁迫中扮演关键的角色,研究发现 MYB 等转录因子在植物抗寒、抗旱、抗盐中起重要作用。植物中很多保守 miRNA 的靶基因多为转录因子,例如 miR159 参与 MYB 类转录因子的调控,miR166 参与 HD-Zip 转录因子的调控,miR319 参与 TCP 转录因子的调控,说明 miRNA 在植物适应非生物逆境环境中起到非常重要的作用。

7 结语

最近几年有关植物 miRNA 研究的大量出现,越来越多的植物 miRNA 被鉴定,大量的 miRNA 靶基因被预测,这些工作为以后的深入研究提供了基础,然而仍有很多问题无法解答,例如很多 miRNA 的功能仍不明确,植物 miRNA 是选择性剪切还是抑制翻译尚属未知。目前的研究表明,植物 miRNA 的沉默方式有抑制 mRNA 翻译和裂解 mRNA。有研究表明不同 miRNA 家族的靶基因存在明显的表达差异,miRNA 丰度和靶基因表达之间没有明显的相关性,所以目前对 miRNA 的调控机理的研究处于探索阶段。miRNA 具有保守性和物种特异性,说明 miRNA 一直进行快速的进化,有些 miRNA 在绝大数的物种中存在,这说明具有高度的保守性,而有些 miRNA 在部分物种中存在,还有些 miRNA 只存在特异的物种中,而且保守的 miRNA 在染色体中的位置相对集中。植物 miRNA 在非生物逆境胁迫下对基因的表达起着重要的调控作用,为我们研究植物抗逆分子机制提供了新的认识。随着对 miRNA 作用机理、调控途径和功能研究的不断深入以及 miRNA 研究方法的不断发展,对 miRNA 在植物发育及相应的非生物逆境胁迫应答的调节机制和调控网络有更清晰的认识。

参考文献:

- [1] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics 2009, 7(4):147-154.
- [2] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Adenylation of plant

- miRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6):1878-1885.
- [3] Castanotto D, Rossi J J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 426-433.
- [4] Zuo J, Wang Y, Liu H, et al. MicroRNAs in tomato plants[J]. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(7): 599- 605.
- [5] Lu X Y, Huang X L. Plant miRNAs and abiotic stress responses[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 368(3): 458-462.
- [6] Covarrubias A A, Reyes J L. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2010, 33(4): 481-489.
- [7] Sunkar R. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2004, 16(8): 2001-2019.
- [8] Lu S, Sun Y H, Shi R, et al. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*[J]. *The Plant cell*, 2005, 17(8): 2186-2203.
- [9] Sanan-Mishra N, Kumar V, Sopory S K, et al. Cloning and validation of novel miRNA from basmati rice indicates cross talk between abiotic and biotic stresses[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(5): 463-474.
- [10] Chen L, Zhang Y, Ren Y, et al. Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in *Populus tomentosa* by high-throughput sequencing[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 892-896.
- [11] Wang T, Chen L, Zhao M, et al. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 367.
- [12] Zhang L, Chia J M, Kumari S, et al. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(11): e1000716.
- [13] Joung J-G, Fei Z J. Computational identification of condition-specific miRNA targets based on gene expression profiles and sequence information[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl 1):S34.
- [14] Addo-Quaye C, Eshoo T W, Bartel D P, et al. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome[J]. *Current Biology: CB* 2008, 18(10): 758-762.
- [15] Addo-Quaye C, Miller W, Axtell M J. CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(1): 130-131.
- [16] Pantaleo V, Szittyta G, Moxon S, et al. Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(6): 960-976
- [17] Zhou M, Gu L, Li P, et al. Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica)[J]. *Frontiers in Biology*, 2010, 5(1): 67-90.
- [18] Valoczi A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22):e175.
- [19] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*[J]. *Plant J*, 2008, 55(1): 131-151.
- [20] Liu H H, Tian X, Li Y J, et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. *RNA*, 2008, 14(5): 836-843.
- [21] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001-2019.
- [22] Buhtz A, Pieritz J, Springer F, et al. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility[J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10:64.
- [23] Zhou Z S, Zeng H Q, Liu Z P, et al. Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal[J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(1):86-99.
- [24] Zhou L, Liu Y, Liu Z, et al. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*[J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(15): 4157-4168.
- [25] Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*)[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3563-3573.
- [26] Lv D K, Bai X, Li Y, et al. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays[J]. *Gene*, 2010, 459(1-2):39-47.
- [27] Liu Q, Zhang Y C, Wang C Y, et al. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(4): 723-728.
- [28] Zhou X, Wang G, Zhang W. UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3.
- [29] Zhou X, Wang G, Sutoh K, et al. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1779(11): 780-788.
- [30] Zeng H Q, Zhu Y Y, Huang S Q, et al. Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(15):1289-1297.
- [31] Bari R, Datt Pant B, Stitt M, et al. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants[J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(3): 988-999.
- [32] Chiou T J. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18(2): 412-421.
- [33] Zhu Y Y, Zeng H Q, Dong C X, et al. MicroRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus* L.)[J]. *Plant Science*, 2010, 178(1): 23-29.
- [34] Frazier T P, Sun G, Burklew C E, Zet al. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 49(2): 159-165.
- [35] Wei L, Zhang D, Xiang F, et al. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2009, 170(8):979-989.
- [36] Huang S Q, Xiang A L, Che L L, et al. A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(8): 887-899.
- [37] Dugas D V, Bartel B. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(4): 403-417.
- [38] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA[J]. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 787-799.
- [39] Kawashima C G, Matthewman C A, Huang S, et al. Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(5): 863-876.