

油菜 miRNA 研究现状与展望

陈 丽^{1,2}, 鲁海琴², 李日慧², 傅廷栋², 沈金雄^{2*}

(1. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆, 408100;

2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家油菜工程技术研究中心, 湖北 武汉, 430070)

摘要: MicroRNA (miRNA) 是一类在真核生物体内广泛存在, 长度为 20~24 nt 的内源性非编码小分子 RNA, 通过介导靶基因的剪切或翻译抑制, 实现转录后基因表达调控, 对多种生命活动起重要作用。随着高通量测序技术的发展, 植物 miRNA 的研究取得重要进展。油菜是重要的油料作物, 目前已挖掘出大量油菜 miRNA 和靶基因。本文综述了近年来油菜 miRNA 参与杂种优势、种子发育、多倍化以及逆境胁迫等调控的研究概况, 并对 miRNA 在油菜中的研究进行展望, 为今后进一步研究提供参考。

关键词: 油菜; miRNA; 杂种优势; 种子发育; 多倍化; 逆境胁迫响应

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2018)05-0664-010

Research progress and prospect of miRNA in *Brassica napus*CHEN Li^{1,2}, LU Hai-qing², LI Ri-hui², FU Ting-dong², SHEN Jin-xiong^{2*}

(1. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China;

2. National Key Lab of Crop Genetic Improvement, National Engineering Research Center of Rapeseed, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a class of endogenous non-coding small RNAs (sRNAs) of 20–24 nt in length which is widespread in eukaryotes. They play crucial regulatory roles in various developmental processes by cleavage target or translation repression at posttranscriptional level. With the improvement of high-throughput sequencing technology, great progress has been made in the studying miRNA of plants. As an important oil crop, a large number of miRNAs and their targets have been discovered in rapeseed, which participate in heterosis, seed development, polyploidy and stress response. In this paper, studies on miRNA involved in the regulation of rapeseed development in recent years were reviewed and prospected, providing references for further studies on functionality of miRNA in the future.

Key words: rapeseed; microRNA; heterosis; seed development; polyploidy; stress response

油菜属十字花科芸薹属, 是世界上分布广、种植历史悠久的重要油料作物之一^[1]。芸薹属栽培种包括白菜 (*B. rapa*; AA, 2n = 20)、甘蓝 (*B. oleracea*; CC, 2n = 18) 和黑芥 (*B. nigra*; BB, 2n = 16) 3 个二倍体基本种以及甘蓝型油菜 (*B. napus*; AACC, 2n = 38)、芥菜型油菜 (*B. juncea*; AABB, 2n = 36) 和埃塞俄比亚芥 (*B. carinata*; BBCC, 2n = 34) 3 个四倍体复合种。在我国, 油菜品种改良经历了甘蓝型油菜替代白菜型油菜和芥菜型油菜, 优质杂交品种替换常

规品种, 优质双低油菜取代双高油菜 3 次飞跃^[2], 为我国油菜产业的快速发展奠定了基础。油菜基因组庞大且复杂, 2014 年甘蓝型油菜全基因组测序的完成为油菜高通量测序数据的挖掘和功能研究提供了有力保证^[3]。

miRNA 是一类长度为 20~24 nt、在生物体内普遍存在且具有重要功能的小分子 RNA^[4]。迄今为止, miRBase 22.0 数据库中已收录了包含 272 个物种的 48 860 条 miRNA 成熟体。其中包括哥伦比亚

收稿日期: 2018-07-

基金项目: 国家自然科学基金(31571698); 国家重点研发计划项目(2016YFD0101300)

作者简介: 陈 丽(1988-), 女, 博士, 油菜遗传育种与分子生物学, E-mail: 331587200@qq.com

* 通讯作者: 沈金雄(1964-), 男, 教授, 博士, 油菜遗传育种与杂种优势利用, E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

型拟南芥中成熟 miRNA 428 个,琴叶拟南芥中成熟 miRNA 384 个,水稻中成熟 miRNA 高达 713 个,而甘蓝型油菜中成熟 miRNA 只有 92 个。基于油菜庞大的基因组,推测油菜成熟 miRNA 应远多于拟南芥和水稻,其 miRNA 的挖掘还需进一步加强。油菜中 miRNA 研究从 2007 年开始,到目前已取得很大进展,包括油菜杂种优势、种子发育、逆境胁迫等过程,但是大多数研究还只停留在初级阶段,还需进一步深入挖掘。本研究对目前油菜中 miRNA 的挖掘和功能研究进展作了概述,并对其研究进行展望,以期对油菜 miRNA 的后续研究提供思路,亦为油菜重要农艺性状改良及油菜产业的发展提供参考。

1 植物 miRNA 研究策略

1.1 miRNA 的生物合成及作用方式

随着 miRNA 研究的深入,miRNA 的生物合成机制取得一定进展。研究结果显示,大部分 *MIR* 基因存在于基因间隔区,少数存在于基因的内含子区^[5]。植物中的 miRNA 的生物合成主要分为四个阶段。首先 *MIR* 基因在细胞核中由 RNA 聚合酶 II 转录成初级转录本^[6];然后在具有 RNaseIII 核酸内切酶特性的 Dicer-like 酶 DCL1、双链结合蛋白辅助因子 HYL1 以及锌指蛋白 SE 的作用下剪切加工成具有发卡结构的 miRNA 前体;miRNA 前体进一步在 DCL1、HYL1、SE 的作用下剪切成 miRNA/miRNA* 二聚体^[7,8];最后 miRNA/miRNA* 二聚体在转运蛋白 HST 的帮助下从细胞核转运到细胞质,解旋形成单链的 miRNA 和 miRNA*,其中一条单链 miRNA* 不稳定,并很快被降解,另一条形成成熟 miRNA^[9]。

大部分成熟 miRNA 在 RNA 诱导沉默复合物(RISC)的介导下行使其功能。主要有两种方式,当 miRNA 与靶基因碱基互补配对程度高时,RISC 在转录后水平对靶基因剪切;当 miRNA 与靶基因碱基互补配对程度低时,RISC 会抑制靶基因翻译,通常这种情况下 miRNA 作用于靶基因的 UTR 区^[10]。植物中 miRNA 的作用机制主要是通过靶基因剪切来影响基因的表达,只有很小一部分是通过靶基因翻译抑制的方式。另外,还有一些非经典模式报道,拟南芥中 miR172 与靶基因 *AP2* 的 ORF 区域完全互补,但并不发挥剪切功能,而是通过介导蛋白翻译抑制^[11]。除此之外,有报道称 miRNA 能够在转录水平上诱导靶标基因位点甲基化,从而沉默靶标基因^[12]。

1.2 miRNA 及其靶基因的挖掘

随着小 RNA 测序技术的普及,miRBase 22.0 数

据库中收录的成熟 miRNA 数目呈几何级数增长。在双子叶植物中,十字花科和豆科植物中发现的成熟 miRNA 很多,蔬菜、果树、药用植物中也发现大量成熟 miRNA。许多单子叶植物,如水稻、玉米、小麦、高粱等中也发现大量成熟 miRNA。不同物种中大部分 miRNA 是高度保守的,甚至有些蕨类植物与开花植物中也存在共同的 miRNA^[4]。通常高度保守的 miRNA 表达量比较高,很容易被检测到。同时,基于 miRNA 测序高通量和高灵敏度的特点,以及 miRNA 前体二级结构的特殊性,还检测到很多不保守的、具有种类特异性的 miRNA。

此外,基于 miRNA 与靶基因的碱基互补配对原则,可利用 psRNA Target 等在线软件预测 miRNA 的靶标。然而软件预测存在准确性差的弊端,且植物体内 miRNA 与靶基因的表达模式存在组织特异性和时空特异性。而降解组测序技术正好克服了以上缺陷,能够在特定的组织中获得可靠的 miRNA 靶标^[13]。目前,降解组测序技术已广泛应用到植物中预测靶基因,如水稻、番茄、棉花等作物中已鉴定出很多 miRNA 的靶基因,其中大部分编码转录调控因子,包括 HD-ZIP、MYB、SPL、TCP、AP2 类转录因子等,这些转录因子参与生命发育的各个过程。另外,还鉴定到一些重要的功能基因以及低丰度表达的靶基因,如 *AGO1* 基因、*DCL1* 基因、PPR 蛋白基因,核糖体蛋白基因等^[14~16]。靶基因的挖掘证实 miRNA 具有重要的研究价值,为 miRNA 的功能研究奠定了基础。

1.3 miRNA 功能的研究方法

高通量测序挖掘的 miRNA 和靶基因需要验证其真实性,才能开展进一步的研究。miRNA 的验证方法主要有 Northern 杂交技术、茎环 RT-PCR、原位杂交、基因芯片等。靶基因的验证方法主要有 5' RACE、烟草瞬时转化、定量 PCR 等。植物体内 miRNA 过多或过少都会造成靶基因的异位表达,影响植物的正常生长发育。因此,可以采用超量表达、抑制表达等技术手段,改变 miRNA 和靶基因的表达模式,研究 miRNA 的功能。miRNA 超量表达是通过构建 miRNA 前体超表达载体,使其在体内转录并加工剪切,提高成熟 miRNA 的表达量;靶基因的超量表达主要是通过对靶位点进行同义突变,构建靶基因超量表达载体导入体内,使原本被 miRNA 抑制的靶基因表达提高。常用的抑制 miRNA 表达的方法主要有两种,一是利用拟南芥中天然存在的 miR399 的模拟靶标 *IPS1* 为骨架,将 *IPS1* 中 miR399 互补区域改造成其他 miRNA 的互补位点,从而竞争性地抑

制相应 miRNA 的功能^[17];二是介导 miRNA 降解,通过人工构建一个由短间隔序列连接的包含两个 miRNA 互补片段的短串联靶基因替代物 STTM,导致 miRNA 降解^[18]。近年来发展的 CRISPR 技术也可用于 miRNA 前体序列敲除抑制 miRNA 的形成。同样,靶基因的抑制表达也主要是通过 CRISPR 和 RNAi 等技术进行敲除或干涉。

此外,还可以对 miRNA 的启动子进行分析,弄清 miRNA 的表达部位及调控元件。另有研究表明 miRNA 前体可以编码小肽,并能够正调控 miRNA 的积累。如苜蓿的 miR171b 和拟南芥的 miR165a 含有编码小肽的开放阅读框^[19],因此,还可以对 miRNA 前体是否编码小肽进行分析,进一步研究其功能。

1.4 miRNA 的生物学功能

miRNA 参与调控植物生长发育的各个时期,以及各种生物与非生物胁迫^[20],其生物学功能研究在一些模式植物中已取得较好的进展。

miRNA 参与分生组织调控,影响植物的形态建成。如 miR165/166 靶向 HD - ZIP III 转录因子,调控顶端分生组织的维持与分化^[21],miR164 能调控腋生分生组织的起始^[22];miR156 和 miR172 调控营养生长到生殖生长的转变等^[23]。miRNA 还能调控植物激素,同时也会受到不同激素的调控,参与到多种生命过程中。如 miR160、miR167、miR393 调控生长素响应因子或生长素受体^[24~26],而 miR159 通过调控多种激素对细胞的命运起决定作用^[27]。此外,miRNA 还能响应各种逆境胁迫,如营养元素的过剩与匮乏,环境灾害胁迫(干旱、高温、冷害、盐胁迫等)以及病虫害引起的生物胁迫等。在缺硫条件下,拟南芥 miR395 诱导表达,促使硫元素向地上部运输^[28];在拟南芥中超量表达 miR159 增强对芜菁花叶病毒 TuMV 的抗性^[29]。除此之外,miRNA 还能跨界作用,如小麦条锈菌 *pst - milR1* 能跨界干扰寄主小麦的重要抗病基因病程相关蛋白 2^[30];植物 miR168 能进入动物体内,升高血液中胆固醇的浓度^[31]。

2 油菜 miRNA 研究概况

2.1 油菜进化过程中 miRNA 的变化

油菜为异源四倍体植物,起源于二倍体祖先种,在进化过程中经历了多倍化和杂交事件,推测油菜 *MIR* 基因在进化上具有重要意义。Shen 等^[32]将油菜 *MIR* 基因与其二倍体祖先白菜和甘蓝进行共线性分析,发现油菜中大部分(75.9%)的 *MIR* 基因起

源于祖先种,还存在少部分 *MIR* 基因丢失与获得事件,说明 miRNA 在进化上高度保守,进化过程中存在基因冗余丢失与基因重组现象。这与棉花 *MIR* 基因进化研究结果类似,在多倍化过程中 miRNA 逐渐趋向于稳定^[33]。李晓康等^[34]研究发现油菜 miR156 相比于祖先种新增 6 个成员,这些新增的成员可能与油菜适应环境有关,在进化上具有重要作用。miR169、miR156、miR168 等家族成员较多,且在染色体上成簇排列。其中 miR169 的家族成员最多,高达 45 个,在 A06 和 C06 染色体上有两个串联重复^[32],基因加倍可能是 miRNA 家族成员扩增的主要原因。在人工合成油菜 S1 ~ S4 世代及其亲本中,从低世代到高世代 miRNA 的变异逐步稳定,大部分的 miRNA 表现为非加性,且在杂交和多倍化过程中起源于转座子的 miRNA 增多,说明 miRNA 参与了多倍化的表观遗传变异^[35]。根据上述研究可以推测,在进化过程中 miRNA 的变异使基因内部调控更加复杂,对植物的变异和适应性起促进作用。

2.2 油菜 miRNA 和靶基因的挖掘

油菜 miRNA 研究始于 2007 年,起步较晚。Xie 等^[36]根据 miRNA 在物种间的保守性,利用拟南芥和水稻中已知的 miRNA,通过生物信息软件对油菜的 EST 序列进行预测,挖掘到 21 个 miRNA 和 67 个靶基因。Wang 等^[37]构建了包含 40 000 条序列的 miRNA 文库,从中克隆到 11 个 miRNA 家族的 36 个 miRNA 和 2 个新预测的 miRNA,这些 miRNA 的发现开辟了油菜 miRNA 研究的征程。

随着高通量测序技术的发展,油菜中 miRNA 的研究进展突飞猛进。Pant^[38]和 Buhtz 等^[39]在油菜木质部和韧皮部汁液中挖掘到 18 个 miRNA 家族中 32 个保守的 miRNA 及大量未知的 miRNA。Huang^[40]和 Zhou 等^[41]对硫缺乏和镉胁迫下油菜幼苗地上部分和根进行 miRNA 测序,分别挖掘到 18 个 miRNA 和 84 个 miRNA。Xu 等^[42]对甘蓝型油菜品种 Westar 叶片进行 miRNA 和降解组测序,鉴定到 41 个保守的和 62 个新预测的 miRNA,还有 52 个靶基因。其中保守 miRNA 的靶基因通常与拟南芥中同源,而不保守 miRNA 的靶基因具有物种特异性,可能参与到特殊的生物过程。此外,油菜作为一种重要的油料作物,很多研究者对不同发育时期的油菜种子发育相关 miRNA 进行研究,以期阐明油脂积累的机制^[43~45]。上述研究主要是以芸薹属作物的 EST、TC 和 GSS 序列作为参考基因组来分析数据,没有覆盖全基因组序列,基因组比对效率不高,挖掘的 miRNA 不是很多。

随着白菜、甘蓝和油菜基因组测序完成,油菜中高通量测序数据的挖掘更为深入。Shen 等^[46]以白菜和甘蓝基因组作为参考基因组,共挖掘到 893 个 *MIR* 基因,并预测到大量靶基因,丰富了油菜 miRNA 和靶基因的数目。Shen 等^[32]利用油菜基因组,鉴定到 645 个 *MIR* 基因,并挖掘到一类参与脂质合成相关的靶基因。此外,还有研究对油菜幼苗、茎

尖、角果等组织进行测序,鉴定到大量 miRNA 和靶基因^[47~49]。综上所述,通过对油菜不同发育时期、不同处理方式、不同组织中 miRNA 进行研究可以看出油菜中 miRNA 的数目很庞大,且大部分 miRNA 具有高度保守性,其调控机制涉及油菜生长发育的各个方面(表 1),充分体现了 miRNA 表达的时序性和组织特异性,是油菜育种研究的重点。

表 1 油菜 miRNA 研究概况
Table 1 General situation of miRNA in *Brassica napus*

发表年份 Published year	参考基因组 Reference genome	研究材料 Tested material	研究目的 Research purpose	参考文献 Reference
2007	EST/GSS 序列 EST/GSS sequence	—	预测 miRNA miRNA prediction	[36]
2007	拟南芥转录本 <i>A. thaliana</i> transcript	20 天幼苗 Seedlings of 20 days old	克隆 miRNA miRNA clone	[37]
2008	miRNA 数据网站 miRNA registry website	木质部和韧皮部汁液 Xylem and phloem sap	miRNA 运输方式 miRNA transport	[39]
2009	拟南芥基因组 <i>A. thaliana</i> genome	氮磷缺乏油菜幼苗 low - N/P plants	缺氮/磷响应 miRNA N/P responsive miRNA	[38]
2010	EST/GSS 序列 EST/GSS sequence	硫缺乏与镉胁迫幼苗 Low - S and Cd exposure plants	硫、镉响应 miRNA S/Cd responsive miRNA	[40]
2012	EST/TC 序列 EST/TC sequence	镉处理幼苗 Cd treated plants	镉响应 miRNA Cd responsive miRNA	[41]
2012	EST 序列 EST sequence	‘Westar’ 油菜叶片 <i>B. napus</i> cv ‘Westar’	挖掘 miRNA 和靶基因 Exploration of miRNA and targets	[42]
2012	EST 序列 EST sequence	早期油菜角果 Early development siliques	miRNA 与油份积累 miRNA with oil production	[43]
2013	白菜基因组 <i>B. rapa</i> genome	种子及种子各个组成部分 Seeds and their components	组织特异 miRNA 的挖掘 Exploration of tissue - specific miRNA	[45]
2014	白菜和甘蓝基因组 <i>B. rapa</i> and <i>B. oleracea</i> genome	黄萎病菌感染幼苗 <i>V. longisporum</i> infected plants	黄萎病菌响应 miRNA <i>V. longisporum</i> responsive miRNA	[46]
2015	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	2 个油菜品种及 4 个 DH 系 Two <i>B. napus</i> cultivars and their four double - haploid lines	miRNA 的进化 Evolution of miRNA	[32]
2016	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	油菜种子(14,21,28DAF) Seeds at 14,21,28 days after flowering	脂肪酸合成相关 miRNA miRNA involved in fatty acid biosynthesis	[52]
2016	白菜和甘蓝基因组 <i>B. rapa</i> and <i>B. oleracea</i> genome	人工合成油菜 S1 - S4 Synthetic <i>B. napus</i> S1 - S4	miRNA 与多倍化 miRNA response to polyploidization	[35]
2016	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	核盘菌感染幼苗 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> infected seedlings	核盘菌响应 miRNA <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> responsive miRNA	[69]
2017	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	开花早期茎尖 Shoot at early flower stages	miRNA 与杂种优势 miRNA involved in hybrid vigor	[48]
2017	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	发育 10 - 40DAF 角果 Siliques at 10 - 40 days after flowering	脂肪酸合成和脂质代谢相关 miRNA miRNA involved in fatty acid and lipid metabolism	[53]
2017	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	腋芽 Axillary bud	miRNA 与分枝角度 miRNA related to branch angle	[70]
2018	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	0 - 7DAF 角果 Siliques at 0 - 7 days after flowering	miRNA 与角果发育 miRNA related to silique development	[47]
2018	甘蓝型油菜基因组 <i>B. napus</i> genome	镉处理幼苗 Cd treated seedlings	镉响应 miRNA 和靶基因 Cd responsive miRNA and target	[57]
2018	白菜基因组 <i>B. rapa</i> genome	冷害胁迫幼苗 Cold stressed seedlings	冷胁迫响应 miRNA Cold stress responsive miRNA	[65]

3 油菜 miRNA 的功能研究进展

3.1 油菜 miRNA 参与杂种优势调控

杂种优势是提高作物产量的有效途径,广泛应用于油菜、玉米、水稻等作物育种中,解析杂种优势的分子遗传机制是提高作物育种效率的重要理论基础。

近年来相继有研究证实,miRNA 在玉米、水稻等作物杂种优势中发挥着重要作用^[50,51]。在油菜中,Shen 等^[48]结合转录组测序、小 RNA 测序和甲基化测序等技术进行表观遗传分析,结果表明,杂交子代中 miRNA 的非加性效应能影响靶基因的表达,调控杂种优势;杂交子代中上调表达的 miR156、miR159/miR319 能调控靶基因 *SPL*、*MYB*/*TCP*,推测它们能改变油菜的株型以适应环境。此外,非加性表达的 miR166、miR164、miR167、miR390 等也可能调控生长素参与杂种优势形成。这一发现拓展了油菜杂种优势机理研究,为油菜杂种优势利用提供了重要的理论依据。

3.2 miRNA 参与油菜种子发育过程

油菜是重要的油料作物,其种子的成熟过程对油份的积累至关重要。Zhao 等^[43]对高油和低油油菜品种早期发育的角果和种子(3、7、14 和 21 days after flowering, DAF)进行两地种植(南京和拉萨)分析,推测 miR390 能通过 ta-siRNA 介导生长素信号 ARF2/3/4 参与早期种子胚胎发育,而 miR156、miR167、miR2203 影响油份积累,初步构建了 miRNA 调控油菜种子油份积累和早期角果发育的模式。Korbes 等^[44]将油菜未成熟(7、14、21、28、42 DAF)与成熟(50 DAF)种子中的 miRNA 进行比较,发现一些与种子发育和能量储藏相关的 miRNA。为了进一步探究 miRNA 在油菜种子发育中的作用,Huang 等^[45]对油菜不同发育时期的种子(10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 DAF)及种子各个组成部分(胚根、胚轴、子叶、胚芽、胚乳、种皮)中的 miRNA 进行分析,发现存在很多组织特异性 miRNA,其中 miR156 在油菜种子中的表达量最高,分析其可能对种子从胚胎到萌芽的转变起重要作用。Wang 等^[52]也对油菜早期发育的种子(14、21、28 DAF)中 miRNA 进行研究,发现 miR156 在 14 DAF 种子中表达量高,而 miR159 在 21 和 28 DAF 种子中表达量高,可见这两个 miRNA 对种子发育起至关重要作用。上述研究基本涵盖了油菜种子发育的各个时期,miRNA 在种子发育中的动态变化充分证明其参与了油菜种子发育调控,为油菜含油量的研究开辟了新思路。

最近,Wang 等^[53]发现油菜 miR9563、miR838、miR156、miR159、miR1134 和两个新预测的 miRNA 的靶基因,能参与乙酰辅酶 A 和碳链脱饱和酶的合成,调控长链脂肪酸的形成、 β -氧化和脂质运输与代谢,推测它们可能参与油份的积累。此外,Wei 等^[54]将拟南芥 miR156b 转入油菜中,发现油菜种子中叶黄素和 β -胡萝卜素含量增加。Song 等^[55]在油菜中超量表达 miR394 及其靶基因 *LCR*,发现 miR319 能改变脂肪酸的组成,而 *LCR* 基因不影响脂肪酸组份,其功能还需进一步确认。

虽然油菜种子发育相关 miRNA 研究有很多,但是对油菜种子含油量有重要贡献的 miRNA 还未见报道,后续将对油菜种子发育相关 miRNA 调控机制进一步研究,以获得更加有效的途径增加油菜含油量,提高油菜的应用价值。

3.3 油菜 miRNA 参与非生物胁迫响应

营养元素与重金属离子胁迫会阻碍植物的正常生长。研究表明,miRNA 可以作为潜在的信息传递分子在细胞之间移动,甚至可以长距离运输到植物的各个组织中调控转录因子,抑制或激活基因的表达,稳定体内营养物质和重金属离子的吸收与代谢^[20]。

Buhtz 等^[39,56]发现油菜韧皮部细胞富含丰富的 miRNA,说明 miRNA 能通过植物的维管组织进行长距离运输,在植物器官营养分配的协调中发挥重要作用。研究还发现 miR395、miR398 和 miR399 分别在硫、铜、磷缺乏的环境下均被诱导上调表达;而 miR169、miR2111 和 miR827 也强烈依赖氮素或磷的状态诱导表达^[38]。证实 miRNA 可以作为长距离的“营养缺乏信号”,调节植物的营养状态。

为探究 miRNA 在油菜镉胁迫下的作用,Zhou 等^[41]对镉处理条件下油菜幼苗中 miRNA 进行分析,发现幼苗地上部分和地下部分受镉胁迫响应的 miRNA 不一致,说明 miRNA 参与镉的吸收与转运的机制不相同。Jian 等^[57]对镉处理幼苗 miRNA 进行分析,发现 miRNA 参与调控的离子转运机制可能与镉胁迫有关。进一步研究发现 miR167 的靶基因是金属转运蛋白基因 *BnNRAMP1*,而 miR158 的靶基因是 RNA 螺旋酶 *BnRH24*,在镉胁迫下 miR167 和 miR158 都被诱导上调表达,抑制靶基因 *BnNRAMP1* 和 *BnRH24* 表达,以减轻镉毒害^[58,59]。同时,还发现 miR395 超量表达油菜中镉积累较高,镉螯合蛋白增多,抗氧化性增强,说明油菜中 miR395 可能提高了镉被螯合的能力,阻碍其向地上部运输,抵御镉毒性^[60]。此外,油菜 miRNA 也参与锌缺乏

和砷胁迫响应^[61,62],进一步揭示了金属离子胁迫机制受 miRNA 调控。在其他植物中还有研究报道 miRNA 能响应铜、铝、铁等金属离子胁迫^[63]。油菜中 miRNA 是如何调控这些金属离子胁迫机制还有待深入研究。

此外,环境胁迫诱导 miRNA 的改变。Bhardwaj 等^[64]对高温、高盐和干旱胁迫下油菜幼苗中 miRNA 进行分析,发现大量 miRNA 响应逆境胁迫。Zeng 等^[65]发现 miR319 和 miR166 等能提高油菜抗冷性。盐胁迫处理油菜根中 miRNA 下调表达,激活靶基因转录调控,提高耐盐性^[66]。

目前,在其他植物中参与非生物逆境胁迫的 miRNA 功能研究得比较深入,而油菜中大部分响应非生物逆境胁迫的 miRNA 调控机理研究得不够深入,解析多种逆境胁迫下 miRNA 的调控网络将会极大促进我们对 miRNA 的认识。

3.4 油菜 miRNA 参与植物病原互作

生物胁迫主要包括病毒入侵、细菌和虫害等,研究发现很多 miRNA 参与生物胁迫以及免疫应答过程^[67]。油菜病害主要有根肿病、黄萎病、菌核病等,严重影响油菜产量,对 miRNA 参与其致病抗病的机理进行研究很有必要。

Verma 等^[68]利用 miRNA 芯片对根肿病菌侵染的油菜根中 miRNA 进行分析,发现 miRNA 调控的生长素响应、细胞分裂素信号转导以及应激反应等参与了根肿病菌侵染过程。Shen 等^[46]在油菜中发现 62 个 miRNA 对黄萎病菌侵染做出响应,其中 miR1885 在接种黄萎病的油菜根中上调表达,其靶基因是编码抗病的 TIR - NBS - LRR R 蛋白基因,因此,了解 miR1885 及其靶基因的调控机制对研究油菜抗病性非常重要。同时,研究还发现 miR168 在接种黄萎病菌的油菜根中显著下调表达,且拟南芥中 *mir168* 突变体与野生型一样易感染病菌,而 *ago1* 突变体抗病能力增强,推测病菌通过将其毒性绑定在 miRNA 效应器 AGO1 上使植物基因沉默,从而使植物感染病菌。

Cao 等^[69]对油菜核盘菌侵染的叶片与未被侵染的叶片进行比较,挖掘到 68 个差异表达的 miRNA,发现它们的靶基因与植物防御相关,表明 miRNA 与植物病原之间确实存在互作。研究还发现 miR168 的靶基因 *AGO1* 和 miR403 的靶基因 *AGO2* 能增强植物对核盘菌侵染的防御^[69],这与前面报道 *AGO1* 调控黄萎病的致病机理不一致^[46],说明 miRNA 对不同病菌的侵染过程存在差异调控。在病菌侵染过程中,miRNA 是参与病菌的防御反应还是致

病性还需进一步研究。

3.5 miRNA 参与油菜发育的其他研究

油菜中 miRNA 的研究还涉及到株型调控、角果发育以及细胞质雄性不育等。Cheng 等^[70]研究发现,一些参与调控生长素的 miRNA 可以作为油菜分枝角度相关的潜在因子,如 miR160 和 miR167 等。Chen 等^[47]对油菜长短角果品系早期发育角果中的 miRNA 进行比较,推测 miR159、miR319、miR160 和 miR2111 等参与调控的细胞分裂、生长素以及养分供应,能影响角果发育,并通过转基因手段证实 miR160 的积累能促进油菜角果发育。miR160 和 miR167 的靶基因都是编码生长素响应因子,说明生长素在油菜株型调控及角果发育过程中起着重要作用。

此外,细胞质雄性不育系、保持系、恢复系三系配套在作物育种上广泛应用,不育机制的研究是油菜育种研究的热点。Yang 等^[71]对芥菜型油菜细胞质雄性不育系和保持系中的 miRNA 进行比较分析,发现了 48 个差异的 miRNA,进一步研究发现线粒体 ATP 酶抑制剂处理后 miRNA 的差异更明显,表明 miRNA 的表达可能受到线粒体基因的调控,然而该研究并没有对 miRNA 参与不育机理进行研究,后续应对候选 miRNA 进行功能验证。总的来说,上述研究进一步拓展了油菜 miRNA 的进展,对后续研究予以启迪。

4 油菜近缘种 miRNA 研究概况

芸薹属是十字花科最为重要的一个属,包含很多重要的蔬菜、油料作物等。除了在油菜中进行 miRNA 研究外,其二倍体基本种及复合种的变种中也开展了 miRNA 的研究,如甘蓝、花椰菜、不结球白菜、大白菜、菜薹等作物中均进行了 miRNA 研究,涉及到花粉发育、育性、开花时间、叶片卷曲、逆境胁迫等多个方面^[72~75]。芸薹属物种的丰富性使其进化研究比较困难,基于 miRNA 的高度保守性,对芸薹属作物中 miRNA 进行挖掘和分析,拓宽了人们对芸薹属作物的认识,尤其是芸薹属中 miRNA 在进化过程中的变异为研究提供了新的方向。

5 存在问题与展望

植物中 miRNA 的研究从 2002 年开始至今^[4],已取得突飞猛进的进展。特别是近年来,越来越多 miRNA 的功能已被证实,如水稻 miR397 调控籽粒大小^[76],miR396 调控水稻株型^[77];大豆 miR156 调控大豆理想株型^[78];高氮条件下玉米 miR528 影响

木质素合成,导致玉米不抗倒伏性^[79];小麦中 miR9678 介导长链非编码 RNA 产生 phasiRNA,控制籽粒的萌发等^[80]。由此可见,miRNA 对作物重要农艺性状的调控起着至关重要的作用,是今后分子生物学研究的热点。

截至目前为止,油菜 miRNA 参与杂种优势、种子发育、多倍化以及各种生物与非生物胁迫等调控的研究已有报道,这些研究增强了人们对 miRNA 发挥作用的认识和理解,挖掘到大量油菜 miRNAs 和靶基因,对探索油菜生长和发育的调控机制有重要意义。然而,大部分 miRNA 与靶基因的真实性还有待进一步验证,尤其是证实 miRNA 的靶基因能初步预测 miRNA 的功能,这是保证后续研究顺利进行最为关键的一步。

相较于其它作物,油菜中 miRNA 的研究还处于相对滞后的阶段,大部分研究还局限在 miRNA 挖掘、表达模式和功能预测方面,对单个 miRNA 的功能以及靶基因的功能研究还比较缺乏。因此,通过超量表达或抑制表达 miRNA 和靶基因,对调控机制进行解析是下一步研究的重点。同时,一个 miRNA 能参与调控多种生命过程,还能受到多种转录因子调控,响应不同的调控机制。比如 miR156 既能参与调控油菜杂种优势^[48],还能参与调控油菜种子发育^[43, 45, 52],表明 miRNA 调控的复杂性和多样性。因此,弄清 miRNA 上下游调控机制,信号通路以及表达部位等将进一步推进 miRNA 的功能研究。

前人对油菜 miRNA 的研究还不够透彻,大部分研究停留在初始阶段。不同研究者对油菜种子发育相关 miRNA 的研究结果不尽相同,可能与不同品种的遗传背景或 miRNA 的表达时空特异性有关,后续将如何利用这些数据还有待思考。笔者认为,可以先对前人研究的结果进行总结归纳,挖掘共性 miRNA,再分析 miRNA 的表达模式,最后对其进行转基因验证,深入探索油菜 miRNA 的功能。

此外,油菜重要产量性状相关的 miRNA 研究还未见详细报道,如种子大小、千粒重、株高、抗倒伏性等,后续将对油菜重要产量性状开展 miRNA 研究,为解决油菜生产的实际问题拓展思路。

参考文献:

[1] 沈金雄,傅廷栋.我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J].中国农业科技导报,2011,13(1):1-8.
[2] 廖星,王汉中.我国油菜品种变革对生产发展的影响[J].中国油料作物学报,2003,25(3):99-103.
[3] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, et al. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome[J]. Science,2014,345(6199):950-953.

[4] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. Genes Dev,2002,16(13):1 616-1 626.
[5] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs[J]. Cell,2009,136(4):669-687.
[6] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. EMBO J,2004,23(20):4 051-4 060.
[7] Dong Z, Han M H, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(29):9 970-9 975.
[8] Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis[J]. RNA,2006,12(2):206-212.
[9] Achkar N P, Cambiagno D A, Manavella P A. miRNA biogenesis: A dynamic pathway[J]. Trends Plant Sci,2016,21(12):1 034-1 044.
[10] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
[11] Chen X M. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development[J]. Science,2004,303(5 666):2 022-2 025.
[12] Wu L, Zhou H, Zhang Q, et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway[J]. Mol Cell,2010,38(3):465-475.
[13] German M A, Pillay M, Jeong D H, et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends[J]. Nat Biotechnol,2008,26(8):941-946.
[14] Wu L, Zhang Q, Zhou H, et al. Rice microRNA effector complexes and targets[J]. Plant Cell,2009,21(11):3 421-3 435.
[15] Karlova R, van Haarst J C, Maliepaard C, et al. Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. J Exp Bot,2013,64(7):1 863-1 878.
[16] Liu N, Tu L, Tang W, et al. Small RNA and degradome profiling reveals a role for miRNAs and their targets in the developing fibers of *Gossypium barbadense* [J]. Plant J,2014,80(2):331-344.
[17] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity[J]. Nat Genet,2007,39(8):1 033-1 037.
[18] Yan J, Gu Y, Jia X, et al. Effective small RNA de-

- struction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (2): 415 – 427.
- [19] Lauressergues D, Couzigou J M, Clemente H S, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides[J]. *Nature*, 2015, 520(7 545): 90 – 93.
- [20] D'Ario M, Griffiths – Jones S, Kim M. Small RNAs: big impact on plant development[J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22(12): 1 056 – 1 068.
- [21] Liu Q, Yao X, Pi L, et al. The *ARGONAUTE10* gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 58(1): 27 – 40.
- [22] Raman S, Greb T, Peaucelle A, et al. Interplay of miR164, *CUP – SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2008, 55 (1): 65 – 76.
- [23] Wu G, Park M Y, Conway S R, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, 138 (4): 750 – 759.
- [24] Liu P P, Montgomery T A, Fahlgren N, et al. Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA160 is critical for seed germination and post – germination stages[J]. *Plant J*, 2007, 52(1): 133 – 146.
- [25] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction[J]. *Development*, 2006, 133(21): 4 211 – 4 218.
- [26] Parry G, Calderon – Villalobos L I, Prigge M, et al. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(52): 22 540 – 22 545.
- [27] Achard P, Herr A, Baulcombe D C, et al. Modulation of floral development by a gibberellin – regulated microRNA [J]. *Development*, 2004, 131 (14): 3 357 – 3 365.
- [28] Kawashima C G, Yoshimoto N, Maruyama – Nakashita A, et al. Sulphur starvation induces the expression of microRNA – 395 and one of its target genes but in different cell types[J]. *Plant J*, 2009, 57(2): 313 – 321.
- [29] Niu Q W, Lin S S, Reyes J L, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1 420 – 1 428.
- [30] Wang B, Sun Y, Song N, et al. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA – like RNA 1 (*Pst* – miR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis – related 2 gene [J]. *New Phytol*, 2017, 215 (1): 338 – 350.
- [31] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross – kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107 – 126.
- [32] Shen E H, Zou J, Hubertus Behrens F, et al. Identification, evolution, and expression partitioning of miRNAs in allopolyploid *Brassica napus* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66: 7 241 – 7 253.
- [33] Xie F, Zhang B. microRNA evolution and expression analysis in polyploidized cotton genome [J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(3): 421 – 434.
- [34] 李晓康, 刘红芳, 刘婧琳, 等. 油菜 miR156 基因家族及其靶基因生物信息学分析及鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(2): 163 – 173.
- [35] Fu Y, Xiao M, Yu H, et al. Small RNA changes in synthetic *Brassica napus* [J]. *Planta*, 2016, 244(3): 607 – 622.
- [36] Xie F L, Huang S Q, Guo K, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus* [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1 464 – 1 474.
- [37] Wang L, Wang M B, Tu J X, et al. Cloning and characterization of microRNAs from *Brassica napus* [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(20): 3 848 – 3 856.
- [38] Pant B D, Musialak – Lange M, Nuc P, et al. Identification of nutrient – responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real – time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(3): 1 541 – 1 555.
- [39] Buhtz A, Springer F, Chappell L, et al. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus* [J]. *Plant J*, 2008, 53(5): 739 – 749.
- [40] 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 Biotechnol J*, 2010, 8(8): 887 – 899.
- [41] Zhou Z S, Song J B, Yang Z M. Genome – wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 4 597 – 4 613.
- [42] Xu M Y, Dong Y, Zhang Q X, et al. Identification of miRNAs and their targets from *Brassica napus* by high – throughput sequencing and degradome analysis [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 421.
- [43] Zhao Y T, Wang M, Fu S X, et al. Small RNA profiling in two *Brassica napus* cultivars identifies microRNAs with oil production and development correlated expres-

- sion and new small RNA classes [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(2):813–823.
- [44] Korbes A P, Machado R D, Guzman F, et al. Identifying conserved and novel microRNAs in developing seeds of *Brassica napus* using deep sequencing[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e50663.
- [45] Huang D, Koh C, Feurtado J A, et al. MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:140.
- [46] Shen D, Suhrkamp I, Wang Y, et al. 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[J]. *New Phytol*, 2014, 204(3):577–594.
- [47] Chen L, Chen L, Zhang X, et al. Identification of miRNAs that regulate silique development in *Brassica napus* [J]. *Plant Sci*, 2018, 269:106–117.
- [48] Shen Y F, Sun S, Hua S, et al. Analysis of transcriptional and epigenetic changes in hybrid vigor of allopolyploid *Brassica napus* uncovers key roles for small RNAs [J]. *Plant J*, 2017, 91:874–893.
- [49] Tang C Y, Yang M K, Wu F Y, et al. Identification of miRNAs and their targets in transgenic *Brassica napus* and its acceptor (Westar) by high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(104):85 383–85 394.
- [50] Barber W T, Zhang W, Win H, et al. Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(26):10 444–10 449.
- [51] Chen F, He G, Hang H, et al. Expression analysis of miRNAs and highly-expressed small RNAs in two rice subspecies and their reciprocal hybrids [J]. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(11):971–980.
- [52] Wang J, Jian H, Wang T, et al. Identification of microRNAs actively involved in fatty acid biosynthesis in developing *Brassica napus* seeds using high-throughput sequencing[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7:1 570.
- [53] Wang Z, Qiao Y, Zhang J, et al. Genome wide identification of microRNAs involved in fatty acid and lipid metabolism of *Brassica napus* by small RNA and degradome sequencing[J]. *Gene*, 2017, 619:61–70.
- [54] Wei S, Yu B, Gruber M Y, et al. Enhanced seed carotenoid levels and branching in transgenic *Brassica napus* expressing the *Arabidopsis* miR156b gene [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(17):9 572–9 578.
- [55] Song J B, Shu X X, Shen Q, et al. Altered fruit and seed development of transgenic rapeseed (*Brassica napus*) over-expressing microRNA394 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0125427.
- [56] Buhtz A, Pieritz J, Springer F, et al. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10:64.
- [57] Jian H, Yang B, Zhang A, et al. Genome-wide identification of microRNAs in response to cadmium stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using high-throughput sequencing[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5):1 431.
- [58] Meng J G, Zhang X D, Tan S K, et al. Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP 1 mediated by miR167 in *Brassica napus* [J]. *Biometals*, 2017, 30(6):917–931.
- [59] Zhang X D, Sun J Y, You Y Y, et al. Identification of Cd-responsive RNA helicase genes and expression of a putative BnRH 24 mediated by miR158 in canola (*Brassica napus*) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 157:159–168.
- [60] Zhang L W, Song J B, Shu X X, et al. miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus* [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 250–251(2):204–211.
- [61] Shi D, Zhang Y, Ma J, et al. Identification of zinc deficiency-responsive microRNAs in *Brassica juncea* roots by small RNA sequencing [J]. *J Integr Agr*, 2013, 12(11):2 036–2 044.
- [62] Srivastava S, Srivastava A K, Suprasanna P, et al. Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 64(1):303–315.
- [63] Sunkar R, Kappor A, Zhu J K, et al. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(8):2 051–2 065.
- [64] Bhardwaj A R, Joshi G, Pandey R, et al. A genome-wide perspective of miRNAome in response to high temperature, salinity and drought stresses in *Brassica juncea* (Czern) L [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92456.
- [65] Zeng X, Xu Y, Jiang J, et al. Identification of cold stress responsive microRNAs in two winter turnip rape (*Brassica rapa* L.) by high throughput sequencing[J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1):52.
- [66] Srivastava A K, Sablok G, Hackenberg M, et al. Thio-urea priming enhances salt tolerance through co-ordinated regulation of microRNAs and hormones in *Brassica juncea* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:45490.
- [67] Li F, Pignatta D, Bendix C, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors [J]. *Proc Natl*

- Acad Sci USA,2012,109;1 790 – 1 795.
- [68] Verma S S, Rahman M H, Deyholos M K, et al. Differential expression of miRNAs in *Brassica napus* root following infection with *Plasmodiophora brassicae*[J]. PLoS One,2014,9(1):e86648.
- [69] Cao J Y, Xu Y P, Zhao L, et al. Tight regulation of the interaction between *Brassica napus* and *Sclerotinia sclerotiorum* at the microRNA level[J]. Plant Mol Biol,2016, 92(1–2):39–55.
- [70] Cheng H, Hao M, Wang W, et al. Integrative RNA – and miRNA – profile analysis reveals a likely role of BR and auxin signaling in branch angle regulation of *B. napus*[J]. Int J Mol Sci,2017,18(5):887.
- [71] Yang J H, Liu X Y, Xu B C, et al. Identification of miRNAs and their targets using high – throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male – sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea* [J]. BMC Genomics,2013,14;9.
- [72] Ren W, Wang H, Bai J, et al. Association of microRNAs with types of leaf curvature in *Brassica rapa*[J]. Front Plant Sci,2018,9;73.
- [73] Zhou Q, Yang Y C, Shen C, et al. Comparative analysis between low – and high – cadmium – accumulating cultivars of *Brassica parachinensis* to identify difference of cadmium – induced microRNA and their targets[J]. Plant and Soil,2017,420(1–2):223–237.
- [74] Song J H, Yang J, Pan F, et al. Differential expression of microRNAs may regulate pollen development in *Brassica oleracea*[J]. Genet Mol Res,2015,14(4):1 524 – 1 534.
- [75] Jiang J, Jiang J, Yang Y, et al. Identification of microRNAs potentially involved in male sterility of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* using microRNA array and quantitative RT – PCR assays[J]. Cell Mol Biol Lett, 2013,18(3):416–432.
- [76] Zhang Y C, Yu Y, Wang C Y, et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching[J]. Nat Biotechnol,2013,31(9):848–852.
- [77] Tang Y, Liu H, Guo S, et al. OsmiR396d affects gibberellin and brassinosteroid signaling to regulate plant architecture in rice [J]. Plant Physiol,2018,176(1): 946–959.
- [78] Sun Z, Su C, Yun J, et al. Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soybean plants via the manipulation of GmmiR156b [J]. Plant Biotechnol J, 2018,DOI 10.1111/pbi.12946.
- [79] Sun Q, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen – luxury conditions[J]. Mol Plant, 2018,11(6):806–814.
- [80] Guo G, Liu X, Sun F, et al. Wheat miR9678 affects seed germination by generating phased siRNAs and modulating abscisic acid/gibberellin signaling [J]. Plant Cell,2018,30(4):796–814.

(责任编辑:肖唐华)