

植物胁迫相关 microRNA 研究进展

王楠楠 王文佳 朱强

(福建农林大学林学院, 福州 350000)

摘要: microRNA (miRNA) 是一种含 20–25 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 并在植物体内广泛存在。miRNA 主要在转录后水平发挥作用, 通过负向调节植物基因的表达, 从而参与调控植物的生长发育、胁迫响应以及激素信号转导等过程。本文从 miRNA 的产生、作用方式出发, 阐述其在胁迫响应过程中的作用机制, 旨在更加深入的了解 miRNA 在胁迫响应过程中的分子调控网络, 以期为未来利用基因工程手段提高植物抗逆性提供参考性作用。

关键词: miRNA; 胁迫响应; 调控; 靶基因

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1345

Research Progress of microRNAs in Plant Stress Responses

WANG Nan-nan WANG Wen-jia ZHU Qiang

(Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000)

Abstract: microRNAs (miRNAs), endogenous non-coding RNAs containing 20–25 nucleotides, exist widely in plants. miRNAs mainly play roles at the post-transcriptional level by negatively regulating the expressions of plant genes, thereby participating in the regulation of plant growth and development, stress response, and hormone signal transduction processes. This article summarizes the current progresses on the generations and functions of miRNA, mainly focusing on their roles in the stress response, aiming to have a deeper understanding of the molecular regulatory network of miRNA in the stress response process, and to provide a reference for improving plant stress resistance through genetic engineering in the future.

Key words: miRNA; stress response; regulation; target gene

miRNA 是一种植物体内广泛存在的内源性非编码 RNA。1993 年, Lee 等^[1] 在秀丽隐杆线虫中首次发现动物 miRNA lin-4, 随后在 2002 年, Reinhart 等^[2] 在拟南芥中也发现了 16 条 miRNA。随着高通量测序和生物信息技术的迅速发展, 越来越多 miRNA 被发现, 截至 2019 年, miRBase (<http://mirbase.org/>) 已经收录了来自 271 个物种的 38 598 条 miRNA 前体和 48 860 条成熟体^[3]。近年来, 越来越多的研究表明 miRNA 在植物的诸多生物学过程中都起着重要作用, 其中 miRNA 在植物生长发育过程中的重要作用已经由前人较为详细的总结^[4-5]。本文侧重阐述

挖掘 miRNA 在植物胁迫响应过程中的作用。

1 miRNA 的产生及作用方式

1.1 miRNA 的产生

miRNA 的基因 (MIR) 被 RNA 聚合酶 II (Pol II) 转录成具有茎环结构的初级 miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 在 RNase III 家族酶 DICER-LIKE1 (DCL1) 的作用下加工形成 miRNA/miRNA* 双链体。双链体的 3' 端被甲基转移酶 HUA ENHANCER1 (HEN1) 2'-O-甲基化。之后, 双链体中的一条链被整合到 ARGONAUTE1 (AGO1) 中以形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC)。以下将详细介绍 miRNA 复杂的产

收稿日期: 2021-10-27

基金项目: 国家重点研发项目 (2021YFD2200504), 国家自然科学基金面上项目 (31870660, 32071847)

作者简介: 王楠楠, 女, 硕士研究生, 研究方向: 林木遗传育种; E-mail: nnwang@fafu.edu.cn

通讯作者: 朱强, 男, 博士, 教授, 研究方向: 林木遗传育种; E-mail: zhuqiang@fafu.edu.cn

生过程。

1.1.1 MIR 转录与转录调控 Mediator 作为一种通用的转录共激活因子,有助于将 Pol II 募集到 MIR 基因座^[6]。还存在一些其他帮助 MIR 转录的蛋白,包括 NEGATIVE ON TATA LESS2 (NOT2)、含有 MYB 结构域的 DNA 结合蛋白 CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5) 和被认为有助于转录延伸的 Elongator 复合物^[7-9]。NOT2、CDC5 和 Elongator 都与 Pol II 以及 miRNA 前体加工复合物相互作用。MIR 转录中的 Pol II 活性还受到磷酸化调节^[10]。

1.1.2 miRNA 前体加工 pri-miRNA 由包含 DCL1、HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) 和 SERRATE (SE) 作为核心成分的切割复合物加工,以产生成熟的 miRNA/miRNA* 双链体^[11]。DCL1 起到剪切的作用,将 pri-miRNA 剪切成 21-nt 的 miRNA/miRNA* 双链体,HYL1 与 DCL1 相互作用以促进有效和精确的 pri-miRNA 的加工^[12]。SE 被认为是拟南芥 miRNA 加工复合体的核心成员,SE 突变导致成熟 miRNA 水平降低、pri-miRNA 水平增加以及 pri-miRNA 剪切缺陷^[13]。

1.1.3 miRNA 稳定化和 RISC 形成 miRNA/miRNA* 双链体的 3'-末端被 HEN1 2'-O-甲基化以稳定。HEN1 最初是在拟南芥中作为甲基转移酶被发现的,它可以特异性地甲基化小 RNA^[14]。拟南芥 HEN1-small RNA 复合物的晶体结构表明小 RNA 双链体与 HEN1 双链 RNA 结合域 (dsRBD) 结合,其中一个末端位于甲基转移酶 (MTase) 活性位点并依赖于 Mg²⁺ 甲基化^[15]。

随后,miRNA 双链体的一条链被选为引导链,而另一条链则被降解。RISC 的形成包括 4 个部分。第一步,AGO1 和 HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) 的二聚体形成复合物。第二步,三磷酸腺苷 (ATP) 与 HSP90 的结合引起 AGO1 构象变化,从而允许双链体结合到 AGO1-HSP90 蛋白复合物中。第三步,ATP 水解诱导 HSP90 从 AGO1 解离。最后,HSP90 解离引起的 AGO1 构象变化去除非引导链并形成成熟 RISC^[16]。

目前尚不清楚 miRNA 是否在 RISC 形成之前被输送至细胞质。在早期模型中,miRNA/miRNA* 双链体通过 HASTY 运输至细胞质,然后装载到 AGO1

上^[17]。然而,最近提出了另一种模型,即 AGO1 的装载发生在细胞核中^[18]。

1.2 miRNA 的作用方式

植物 miRNA 通过两种主要机制在转录后水平调节靶基因:mRNA 的剪切和翻译抑制^[19]。在植物中,miRNA 与靶标 mRNA 具有近乎完美的互补性,因此,对转录本剪切被认为是植物 miRNA 的主要作用方式。然而,这是一种误解。虽然高度互补的序列有利于对 mRNA 的切割,但它也同样发挥翻译抑制的作用。事实上,经过实验验证,靶基因也会经历 miRNA 介导的翻译抑制^[20]。除了 mRNA 切割和翻译抑制外,一些 miRNA 还触发一些特殊靶基因转录本产生次级 siRNA (phasiRNAs),成熟的 phasiRNA 通过碱基互补配对原理在转录后水平发挥负向调控作用,这是植物中普遍且保守的现象^[21]。

2 miRNA 参与胁迫响应

研究表明,miRNA 在多种生物学过程中起着重要的调节作用,包括植物的发育、代谢、非生物胁迫以及病原体防御等过程(图 1)。环境胁迫能诱导植物在表型和生理生化上产生一系列的变化以适应其正常生长,例如在表型上调整植株的大小、叶片大小及卷曲程度、根的生长情况、气孔开合以及细胞大小等;生理生化上表现在次级代谢物积累、光合作用的抑制、呼吸作用的加强以及一些抗氧化酶的激活等。并且为了适应环境,植物也进化出各种抗逆机制,例如脱落酸 (abscisic acid, ABA) 合成、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除、离子平衡、乙烯反应和调节下游防御反应的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径等。探究 miRNA 在植物响应环境胁迫过程中的分子机制,有利于未来利用基因工程技术提高植物抗性、改良植物品质。

2.1 非生物胁迫

2.1.1 干旱胁迫 干旱是决定植物生产力和分布的重要环境因素之一。miR156 是植物中最早被发现的一种 miRNA,它与 SQUAMOSA-promoter binding like (SPL) 转录因子的相互关系在植物中普遍保守。玉米 miR156 在烟草内过表达能提高转基因植物的抗旱性,进一步研究表明,抗旱性的提高与脯氨酸等次级代谢物的积累以及抗氧化酶表达量升高有

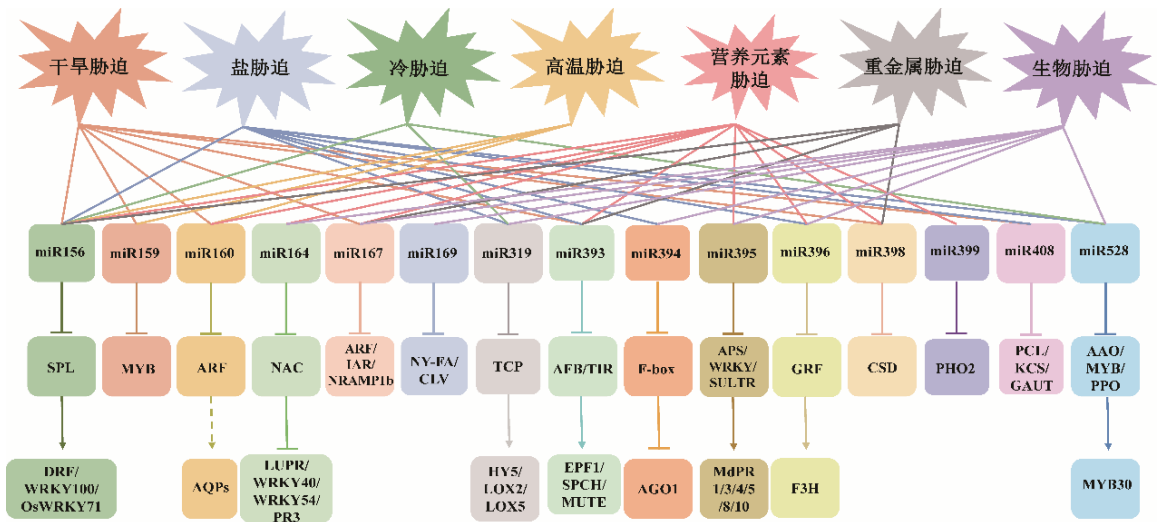


图1 miRNA在胁迫响应过程中的作用

Fig. 1 Role of microRNA in plant stress responses

关^[22]。番茄 miR159 也可通过调节 MYB33 的转录水平诱导脯氨酸和腐胺的积累从而帮助植物提高抗旱性^[23]。花青素作为一种次级代谢产物通过清除 ROS 以保护植物免受胁迫。在拟南芥、水稻、紫花苜蓿以及杨树中，都存在 miR156/SPL 通过调节花青素的积累水平响应植物干旱胁迫的机制^[24-26]。其中，苜蓿 SPL13 可以直接与编码花青素生物合成过程关键酶基因 DIHYDROFLAVONOL-4-REDUCTASE (*DFR*) 的启动子区域相结合调节其表达。

气孔是植物叶片表皮中的“窗口”，在植物与环境之间的气体交换中起核心作用，气孔的开关受环境信号和内源性激素调节进而影响植物对干旱胁迫的反应和耐受性。而 ABA 作为一种内源性植物激素，是调节水分流失和气孔开合的关键激素。有研究表明 Auxin response factors 10 (*ARF10*) 作为 miR160 的靶基因通过影响气孔开合进而参与番茄干旱胁迫过程，35S : mSIARF10 转基因番茄表现出叶片变窄、气孔变大等表型，SIARF10 不仅影响 ABA 合成，而且也影响气孔发育和水通道蛋白基因 (*AQPs*) 表达，这两者协同作用可以控制番茄叶片水分的流失^[27]。miR393-OE (miR393 overexpressing transgenic line) 表现出气孔密度的增加以及保卫细胞长度的减少，而缺失型突变体表现出相反的表现型，这可能与 miR393 靶基因 *ARF5* 以及气孔发

育相关基因 EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (*EPF1*)、SPEECHLESS (*SPCH*) 以及 *MUTE* 的沉默有关。miR393-OE 对干旱处理更为敏感，能积累多于野生型的丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和过氧化氢 (H_2O_2)，同时还能抑制 ABA 在叶片的积累。这些结果也证明了 miR393 通过与 ABA 之间的相互作用以及调控气孔密度从而响应植物干旱胁迫^[28]。Zhao 等^[29] 构建的过表达 *Osa-miR393a* 的转基因匍匐翦股颖表现出与气孔密度和表皮致密相关的干旱胁迫耐受性的增强，还确定了 miR393 的两个靶标 Auxin signalling F-BOX 2 (*AsAFB2*) 和 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (*AsTIR1*)。独脚金内酯是植物地上部分适应干旱胁迫所需的一种植物激素。对番茄施加外源的独脚金内酯诱导 miR156 的积累，miR156-OE 和独脚金内酯的处理都会使植物气孔导度降低以及 ABA 敏感性增加^[30]。而 miR398c 却负向调控大豆的抗旱性，过表达 miR398c 通过下调过氧化物酶体相关基因 (*GmCSD1a/b*、*GmCSD2a/b/c* 和 *GmCCS*) 的表达削弱其清除 ROS 的能力，引起电解质泄漏和气孔打开^[31]。

植物通过表型的改变以适应干旱胁迫，例如改变根构型以更好的吸收土壤中的水分、调整叶片大小及卷曲程度以减轻水分蒸发等。研究人员在拟南芥中鉴定出 miR167 的新靶点 IAA-Ala Resistant 3

(*IAR3*), *IAR3* 具有将非活性形式的生长素水解并释放出活性形式的功能。干旱胁迫下 *miR167* 表达量下降导致 *IAR3* 积累从而提高生长素 (auxin) 水平以促进侧根生成^[32]。Yang 等^[33] 在拟南芥中研究了 *miR160* 和 *miR165/166* 之间的相互作用及其对拟南芥叶片发育和耐旱性的影响。发现 *STTM160* 莲座叶呈现明显的锯齿状, *STTM165/166* 呈现出严重的向上卷曲, 而 *STTM160 × 165/166* 呈现出轻微的向下卷曲。研究结果还显示, *miR160* 指导 ARF 通过生长素信号途径促进叶片发育, 而 *miR165/166* 介导的 HD-ZIP IIIs 通过 ABA 信号途径赋予植物耐旱性。在干旱胁迫下, 异源表达 *OsmiR408* 的转基因黑麦草与野生型相比, 表现出叶片卷曲、气孔凹陷等表型, 这与其保持较高的叶片相对含水量、较低的电解质渗透率和较少的脂质氧化相关, 使转基因植株表现出更强的抗旱能力^[34]。

2.1.2 盐胁迫 土壤盐碱化是植物面临的一种非常普遍的非生物胁迫, 它影响了世界上约 6% 的土地和 23% 的耕地。盐碱化严重影响了作物的生存环境和产量, 造成了相当大的经济损失。植物受到盐胁迫会显著影响多种内源性信号分子的水平, 包括 ABA、乙烯、赤霉素 (gibberellin, GA)、ROS、一氧化氮 (NO) 等。这些信号分子及其下游信号成分已被证明在植物盐胁迫响应中发挥着重要作用。拟南芥 *miR394* 及其靶基因 *LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* 将 ABA 与盐胁迫响应联系起来。*miR394* 受 ABA 诱导而积累, *LCR* 则相反。盐胁迫实验表明 *miR394* 作为植物盐胁迫响应的负调节因子, 过表达促进 ABA 引起的气孔关闭、ROS 的积累以及 ABA 响应基因的表达^[35]。过表达 *Sm-MIR408* 的转基因烟草则能在促进种子萌发的同时减少盐胁迫下 ROS 的积累, 并且增强抗氧化基因的转录水平及其酶活性^[36]。乙烯信号途径主要通过调节 ROS 产生和 ROS 清除机制来响应盐胁迫反应。Liu 等^[37] 在柳枝稷耐盐性实验研究中发现, *miR319-OE* 转基因柳枝稷通过抑制靶基因 *PvPCF5* 的表达进而下调蛋氨酸循环中关键基因的表达, 从而促进乙烯合成相关基因表达以提高耐盐性。

在研究匍匐剪股颖植物响应盐胁迫的分子机制时发现, 过表达 *Osa-miR528* 的转基因匍匐剪股颖

节间缩短、分蘖数增加, 通过改善植物保水性、细胞膜完整性、叶绿素含量, 维持钾离子稳态、过氧化氢酶活性以及降低抗坏血酸氧化酶 (ascorbic acid oxidase, AAO) 活性而提高植物对盐胁迫的耐受性^[38]。过表达 *Osa-miR393a* 的转基因匍匐剪股颖通过正向调控离子转运相关基因 (*AsNHX1*) 的表达, 促进转基因植物钾离子的吸收以达到耐盐性增强的作用^[29]。Yuan 等^[39] 对 *miR396* 与耐盐性之间机制进行研究时发现, *Osa-miR396c* 转基因植物与野生型相比, 表现出生物量减少、节间减短、叶片面积减少、叶脉数量减少、单位面积表皮细胞减少的表型, 而在高盐胁迫下表现出保水性增强、叶绿素含量增加、细胞膜完整性高和钠离子外排增强等耐盐性等表型。

WRKY 转录因子通过参与 ABA 合成、ROS 清除、离子平衡和乙烯反应途径参与盐胁迫耐受相关的生物学途径以保护植物免受盐胁迫损害。然而关于 WRKY 上游的调控机制尚未可知。近期在苹果盐胁迫与 *miR156* 的研究中发现, *miR156-OE* 减弱植物耐盐性, 其靶基因 *SPL13* 的过表达能增强耐盐性, 同时揭示了 *SPL13* 直接与 *WRKY100* 相互作用以增强植物耐盐性^[40]。

2.1.3 低温胁迫 低温胁迫通过影响光合作用、呼吸作用以及 ROS 的产生和积累而对植物产生一系列负面作用。*miR319* 已被证明可靶向 *TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF (TCP)* 转录因子, TCP 基因家族是高等植物特有的转录因子, 这类转录因子通过控制细胞增殖以参与调节植物生长发育的多个过程, 它们的特征是在 N 末端具有高度保守的 59 个氨基酸构成的 TCP 结构域。*Osa-miR319* 的表达受低温诱导下调, 其靶基因 *OsPCF6* 和 *OsTCP21* 则相反。*Osa-miR319* 过表达导致植物对低温胁迫耐受性增强, 这可能与脯氨酸的积累、*OsPCF6* 和 *OsTCP21* 调节的 ROS 的清除以及以一些低温响应基因表达量升高有关^[41]。在甜瓜中, 低温诱导 *miR319c* 表达量降低, 引起 TCP2 介导的 *ELONGATED HIPOCOTYL 5 (HY5)* 水平增加, *HY5* 转录因子通过调节花青素生物合成途径中关键成分积累从而响应低温胁迫^[42]。番茄 *miR319d* 过表达也增强其冷胁迫耐受性, 具体表现在电解质渗透率、MDA 浓度、 O_2^- 浓度和 H_2O_2 浓度的降低以及

叶绿素含量和 Fv/Fm 值的增高,这可能与 *FeSOD*、*CuZnSOD* 和过氧化氢酶 (*CAT*) 基因表达水平升高以及 *GAMYB-like1* 表达水平降低有关^[43]。

OsmiR528 过表达增强了拟南芥、松树和水稻的冷胁迫耐受性。*OsmiR528* 通过靶向 *F-box* 进而降低转录因子 *OsMYB30* 的表达。据报道, *OsMYB30* 促进 β 淀粉酶 (β -amylase, *BMV*) 基因 *OsBMV2*、*OsBMV6* 和 *OsBMV10* 表达从而增加细胞中糖含量以增强植物冷胁迫耐受性^[44]。香蕉 *miR528* 在冷胁迫下显著下调,其靶基因多酚氧化酶 (*Polyphenol oxidase*, *PPO*) 基因的表达量则上调 100 倍以上,这引起 ROS 含量激增,使得香蕉果实果皮褐变^[45]。水稻 *miRNA156* 过表达导致拟南芥、松树和水稻在冷胁迫下细胞活力和生长速率增加。*OsmiR156* 通过靶向 *OsSPL3* 增加植物耐寒性, *OsSPL3* 正向调节 *OsWRKY71* 的表达,而 *OsWRKY71* 是转录因子 *OsMYB2* 和 *OsMYB3R-2* 的负调节因子。*OsMYB2* 和 *OsMYB3R-2* 分别通过激活 *OsLEA3*、*OsRab16A*、*OsDREB2A* 和 *OsKNOLLE2*、*OsCTP1*、*OsCycB1.1*、*OsCycB2.1* 和 *OsCDC20.1* 表达来抵消低温胁迫所带来的负面影响^[46]。

2.1.4 高温胁迫 高温作为一个重要的环境因素,会对植物生长、发育、繁殖等过程产生负面影响。植物响应高温胁迫是一个复杂的过程,涉及各种代谢和生化过程。苜蓿中的相关研究证明 *miR156* 参与植物热胁迫响应过程, *mi156-OE* 转基因植物通过抑制靶基因 *SPL13* 从而增强其耐热性^[47]。Arshad 等^[48] 测量了热胁迫下野生型和 *miR156-OE* 转基因植物的各项生理参数,并收集了叶组织进行蛋白组分析,发现 *miR156-OE* 植物中的脯氨酸和抗氧化剂含量高于野生型, *miR156-OE* 植物特有的蛋白质与多种功能有关,包括代谢、光合作用、应激反应和植物防御。

miR159/MYB 在小麦和白菜的热应激过程中都起重要作用,小麦 *miR159* 过表达与靶基因 *GAMYB* 表达的下调相结合会导致其耐热性的降低,但单独过表达 *GAMYB* 却没有提高幼苗的耐热性,所以, *miR159/GAMYB* 途径与热应激耐受性之间的因果关系还需要进一步研究^[49-50]。此外,过表达 *miR160* 可以增加棉花对高温胁迫的敏感性,这与 *ARF10* 和 *ARF17* 表达受到抑制从而激活导致花药开裂的 Auxin

信号通路有关^[51]。

2.1.5 养分胁迫 氮是植物中许多重要化合物的主要成分,参与植物一系列生化反应,并在作物的生物量积累和产量提升中发挥重要作用。钾则参与渗透调节、光合作用、物质运输等过程,可以提高植物的抗逆性。因此,缺乏这两种元素会导致植物生长受到限制。对花生的营养缺乏机制研究中发现,氮和钾缺乏会影响植物的生长,使植物表现出地上和地下部分组织干重降低,根长、根表面积、根体积、根活力降低和根呼吸减弱。氮缺乏显著降低初生根长度和侧根数量,这可能与 *miR160*、*miR167*、*miR393* 和 *miR396* 的上调以及 *AFB3* 和 *GRF* 的下调有关。主根和侧根对缺钾的反应与缺氮条件相反,表现为 *miR156*、*miR390*、*NAMATAF-CUC 4* (*NAC4*)、*ARF2* 和 *AFB3* 的上调,以及 *miR160*、*miR164*、*miR393* 和 *SPL10* 的下调,这些可能有助于缺钾条件下初生根和侧根的生长^[52]。

磷是植物不可或缺的一种常量营养元素,在发育和代谢过程中都很重要。虽然土壤中磷含量丰富,但大多数土壤中磷与钙、铁和铝等元素结合形成不溶性的化合物,限制了植物对磷的获取。缺磷是植物生长和发育过程中的常见胁迫。*miR156/SPL3* 在拟南芥磷吸收过程中发挥着重要作用,过表达 *miR156* 的转基因植株与野生型相比磷吸收速度加快,并在缺磷状态下能减少根际酸化和花青素积累^[53]。据报道, *miR399* 是磷饥饿信号途径中的重要组分。最早在拟南芥中阐明 *miR399* 在磷饥饿信号传导中的功能,在磷饥饿条件下, *miR399* 的表达被显著提高,而靶基因 ubiquitin-conjugating E2 enzyme (*PHO2*) 表达降低。为进一步研究 *miR399* 的功能, Hu 等^[54] 对 *OsmiR399* 过表达植物进行了基因芯片分析发现,除了磷饥饿反应基因外,许多参与铁、钾、钠和钙吸收的基因也被显著上调,铁、钾、钠和钙的浓度也有所增加。此外, *OsmiR399* 下游靶标 *LTN1* (*OsPHO2*) 的功能丧失也导致这些营养元素浓度增加以及相关基因的上调。*miR399-PHO2* 途径参与植物对磷缺乏的适应性反应同样在玉米中存在^[55]。

硫元素参与植物发育的许多重要机制和途径。土壤中的硫元素主要以硫酸盐 (SO_4^{2-}) 形式存在并

被吸收入根组织,通过脉管系统输送至地上部分,被还原成亚硫酸盐后在叶绿体和线粒体等亚细胞器官中硫化,用于半胱氨酸和蛋氨酸生物合成。而空气中的 SO_2 是一种常见的污染物,在植物中, SO_2 主要通过叶组织气孔吸收,然后水合形成亚硫酸盐和亚硫酸氢盐。Yuan 等^[56]发现 *Osa-miR395* 的转录水平在硫酸盐缺乏条件下增加,这与前人在拟南芥中的研究结果相同。将 *Osa-miR395h* 在烟草中异源过表达损害了烟草硫酸盐稳态, *NtaSULTR2* 作为 *miR395* 的靶点,属于低亲和力硫酸盐转运蛋白。Li 等^[57]发现拟南芥暴露在 SO_2 中, *miR398* 的表达下调,而靶基因铜或锌超氧化物歧化酶 (Cu or Zn superoxide dismutases, *CSD*) 的转录水平增加,同时 SOD 活性随着 *CSD* 转录水平的增加而增强,表明 *miR398* 在响应 SO_2 诱导的氧化应激中起重要作用。然而, *miR395* 的表达受 SO_2 影响增加,下游靶基因 *APS3* 和 *APS4* 以及 *SULTR2;1* 的转录水平在拟南芥中降低,表明 *miR395* 在 SO_2 暴露期间硫酸盐同化和易位的调节中发挥了重要作用。

2.1.6 重金属胁迫 重金属元素被认为是植物的生长和产量的主要限制因素,包括必需金属元素和非必需金属元素。多种生理过程需要必需金属元素,例如锌、锰和铜等,其他一些金属,如镉、铅或汞则是非必需金属元素。植物重金属中毒的显著特征是酶反应的中断和氧化应激。天然抗性相关巨噬细胞蛋白 (natural resistance-associated macrophage proteins, *NRAMP*) 是植物中不可或缺的膜转运蛋白,负责转运必需金属元素如锰或铁以及非必需金属如镉或铅。在甘蓝型油菜中发现了一个组成型基因 *BnNRAMP1b*, 它受镉胁迫而上调。结合降解组相关信息验证了 *BnNRAMP1b* 作为 *miR167* 的靶基因参与金属胁迫响应^[58]。过表达 *miR156* 的转基因拟南芥减少地上部分重金属镉积累,增强了植物对镉胁迫的耐受性。在镉胁迫下, *miR156OE* 具有初生根增长、生物量和叶绿素含量增高、抗氧化酶活性增强、ROS 水平降低以及镉转运相关基因表达量降低的表现,而 *MIM156* 则相反^[59]。

miR393 在植物根组织铝中毒胁迫中具有一定的生物学功能。土壤中铝离子抑制大麦根尖 *miR393* 的表达, *miR393* 的过表达可以消除铝离子对根伸

长的抑制以及 ROS 积累所导致的细胞死亡。此外, *miR393* 过表达减弱了外源生长素对铝诱导的根生长抑制的影响,并下调了铝胁迫下生长素响应基因的表达,这意味着 *miR393* 是通过改变大麦中的生长素信号输出来调节根对铝的敏感性^[60]。

葡萄 *miR398* 通过调节靶基因 *VvCSD1* 和 *VvCSD2* 的表达,调控其对铜胁迫的响应过程。*Vv-miR398* 的表达受到不同浓度铜胁迫抑制,而 *VvCSD1* 和 *VvCSD2* 基因的表达增强。与野生型相比, *VvCSD* 过表达转基因植株具有更高的铜耐受性,并且在高浓度铜胁迫条件下降低 ROS 积累、提高 SOD 活性,这表明 *VvCSD* 增强 ROS 清除系统从而保护植物免受更多氧化损伤^[61]。

2.2 生物胁迫

植物病原体包括害虫、真菌、细菌以及病毒,它们严重威胁植物的正常发育。植物免疫系统通过上调或下调 *miRNA* 的表达来诱导下游转录因子和基因表达以抵抗病原体的入侵。Caruana 等^[62]发现 *miR167* 通过 *ARF6* 和 *ARF8* 调节植物对病原体的防御反应。*miR167* 响应细菌病原体假单胞杆菌而差异表达,其过表达赋予植物更高的抗菌性。这种抗性与生长素信号转导、水杨酸信号传导及气孔运动有关。此外, *miR167-OE* 转基因植物的系统性获得抗性 (systemic acquired resistance, *SAR*) 反应也受到严重损害,进一步研究表明 *SAR* 的激活需要完整的生长素信号转导过程。总之, *miR167* 在激素平衡以及植物生物防御过程中起着重要作用。

miR169 在植物生物胁迫过程同样发挥着重要的作用。拟南芥 *miR169* 靶基因 *CLAVATA1* (*CLV1*) 和 *CLAVATA2* (*CLV2*) 的突变赋予植物更强的抗病性,而 *miR169* 的过表达能够消除 *clv* 突变体的抗病性表型^[63]。水稻 *miR169* 过表达植株对病菌的侵染高度敏感,这与防御相关基因表达量的降低以及感染部位缺乏过氧化氢积累有关。此外, *miR169* 通过抑制核转录因子 Y (Nuclear factor Y, *NF-YA*) 基因的表达而在对病菌的免疫过程中起负向调节因子的作用^[64]。然而,香蕉 *miR169a* 和 *miR169b* 表达量在被病原体侵染后上调并在香蕉抗性品种中保持较高表达水平^[65]。

NAC4 作为 miR164 的靶基因之一,在拟南芥响应生物胁迫的细胞程序性死亡中发挥作用。研究表明 *NAC4* 过表达体和 miR164 沉默型植株对细菌病原体的过敏反应更加强烈,细胞死亡症状增强,而 *NAC4* 的下游基因 *LURP1*、*WRKY40* 和 *WRKY54* 在细胞程序性死亡过程充当负向调节因子^[66]。Wang 等^[67]发现,过表达 miR164 的靶基因 *OsNAC60* 增加细胞程序性死亡、加快离子泄漏、增强 ROS 积累、胼胝质沉积以及防御相关基因的上调,而增强水稻对稻瘟症的抵御能力。在上述研究中,miR164 在植物生物胁迫过程中发挥消极作用,然而,在最新研究中也发现其具有积极调控作用。Hu 等^[68]在对棉花黄萎病的研究中发现,ghr-miR164 作为正向调节因子可提高棉花对黄萎病的抗性,沉默其靶基因 *GhNAC100* 也可增强抗病性。还发现 *GhNAC100* 与 *GhPR3* 启动子的 CGTA box 结合抑制其表达,从而减弱植物抗病性。此外,miR164 也在小麦的叶锈病以及杨树黑斑病防御过程中发挥重要作用^[69-70]。

miR319 在生物胁迫过程也起重要作用。番茄 miR319-TCP4 通过影响茉莉酸 (jasmonic Acid, JA) 合成基因表达和叶片内源 JA 水平,进而影响植物对根结线虫的抗性^[71]。Zhang 等^[72]发现米曲霉菌株感染能特异性诱导水稻 miR319 的表达,抑制其靶基因 *OsTCP21* 表达。当 miR319b-OE 水稻受米曲霉菌感染时,LIPOXYGENASE2 (*LOX2*) 和 *LOX5* 作为 JA 合成过程中的关键酶被抑制表达^[72]。Fan 等^[73]报告了 miR319a/TCP 参与毛白杨 GA 信号转导以及毛状体形成过程。miR319a 过表达降低靶向的 *TCP* 转录水平,显著提高转基因杨树的叶毛密度,从而减轻昆虫危害性。

大蒜受病原体侵害诱导 miR394 表达而下调 *F-box* 和 cytochrome P450 (*CYP450*) 基因,因此 miR394 及其对靶基因调控强度的差异可作为选择抗病大蒜品种的标志^[74]。miR394 作为拟南芥应对细菌感染的负调控因子,其过表达通过影响 *LCR* 以及许多参与植物 miRNA 代谢的关键基因 *AGO1* 表达从而提高植物对细菌的易感性^[75]。Zhang 等^[76]在番茄中的研究也验证了 miR394 参与负向调控生物胁迫,miR394 的过表达抑制其靶基因 *LCR* 的表达,进而抑制 JA 合成相关基因,从而降低番茄对致病疫霉

的抗性。

在研究 miR396 在植物生物胁迫过程中作用时发现,miR396 表达量降低赋予植物对真菌病原体的广泛抗性^[77]。水稻过表达 miR396 靶基因 Growth Regulating Factor (*GRF*) 的转基因植物显示出更强的抗菌性,表明 miR396 通过抑制 *GRF* 而负向调控水稻对细菌侵染的抗性^[78]。Chandran 等^[78]证明过表达 miR396 转基因株系对米曲霉高度敏感,而过表达其靶基因 *OsGRF6*、*OsGRF7*、*OsGRF8* 和 *OsGRF9* 的转基因植物对米曲霉的抗性增强。进一步研究显示,MIM miR396 和 *GRF8*-OE 植物中类黄酮含量均增加,黄酮含量的增加与病原体抗性增强相关,这揭示了 miR396-*GRF8*-F3H-类黄酮途径介导的新的病原体抗性机制^[79]。

Zhang 等^[80]在对苹果抗菌性研究中发现,接种叶斑病真菌的叶片上,MdmiR395 表达水平升高而其靶基因 *MdMRKY26*、*MdWRKYNI* 表达降低。过表达 *MdWRKY* 或抑制 MdmiR395 可以增加与抗病相关 (pathogenesis-related, *PR*) 基因的表达从而增强苹果的抗病性。Wu 等^[81]发现,当水稻遭受病毒危害时,miR528 表达受抑制,这促进其靶基因 L-抗坏血酸氧化酶 (L-ascorbate oxidase, *AO*) 表达从而减少 *AO* 介导的活性氧的积累。在之后的研究中又发现 miR528-*AO* 防御模块受 *SPL9* 的调控,*SPL9* 与 miR528 启动子区域内特定基序结合从而激活 miR528 基因的表达^[82]。

3 总结与展望

环境胁迫是影响植物正常生长发育的重要因素之一,不同的环境胁迫会诱导 miRNA 的差异性表达。miRNA 作为调节植物胁迫响应的调控网络中心,其一举一动都会引起“蝴蝶效应”,因此对 miRNA 的研究有助于改良植物的遗传性状,提高其抗逆性。研究表明即使是同种 miRNA 在不同物种中对胁迫响应表现不同。例如,不同物种 miR156 在盐胁迫下的表达模式不同,苹果、玉米相似,拟南芥、甘蔗和水稻相似^[24, 40, 83-85]。木本植物和草本植物在生命周期方面的差异可能解释了这种现象。一年生草本植物的生命周期比多年生木本植物短,所以当草本植物受到盐胁迫时,它们会将能量分配给防御机

制, 于是引起 miR156 积累抑制 SPL 表达, 从而延长植物的幼年期, 使其增强对不利环境条件的耐受性。与拟南芥和其他草本植物不同, 多年生木本植物的幼年期较长, 其与耐盐性之间的关系可能比草本植物更复杂。当苹果受到盐胁迫时, 它通过下调 miR156 以上调下游靶基因 *SPL*。某些 SPL 可增强侧根伸长和生物量积累, 以抵消盐胁迫引起的能量消耗。其他 SPL 通过调控下游基因表达以调节植物生理和代谢过程以响应盐胁迫。除此之外, miR164、miR169 在不同物种的生物胁迫方面也起着不同的调控作用^[64-68]。即便依据 miRNA 片段小以及遗传冗余等特点, 研究人员已经开发了 Target mimicry (MIM)、Short tandem target mimic (STTM) 技术等, 但是大量的研究结果显示, miRNA 具有组织和器官特异性。例如 miR159 在不同组织的表达量不同^[86-88]。但目前尚没有确切的机制解释这些现象。未来对于单个 miRNA 的通路研究将可能说明这一现象, 这将会成为未来研究趋势之一, 其中单细胞测序技术可能在其中发挥重要作用。

随着二代测序技术以及 miRNA 研究技术的不断发展, 越来越多新的 miRNA 被发现。然而目前的研究大多仅局限于 miRNA 及其靶基因在生物学过程中的作用, 而 miRNA 是如何接收到上级信号以及通过级联反应影响下游各种调控途径的分子机制尚不清楚。因此, 建立更为系统的 miRNA 调控网络将会成为未来另一个趋势。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene Lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to Lin-14 [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 843-854.
- [2] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. microRNAs in plants [J]. *Genes Dev*, 2002, 16 (13): 1616-1626.
- [3] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (D1): D155-D162.
- [4] 黄俊骏, 刘文文, 郭亚如, 等. microRNA 在植物生长发育中的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35 (11): 141-149.
Huang JJ, Liu WW, Guo YR, et al. Research progress of microRNA in plant development [J]. *Biotechnol Bull*, 2019, 35 (11): 141-149.
- [5] 郁佳雯, 韩荣鹏, 仇婷, 等. microRNA 在植物生长发育中的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18 (5): 1496-1504.
Yu JW, Han RP, Qiu T, et al. Research progress on microRNA in plant growth and development [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, 18 (5): 1496-1504.
- [6] Kim YJ, Zheng BL, Yu Y, et al. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana* [J]. *EMBO J*, 2011, 30 (5): 814-822.
- [7] Wang LL, Song XW, Gu LF, et al. NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25 (2): 715-727.
- [8] Zhang SX, Xie M, Ren GD, et al. CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (43): 17588-17593.
- [9] Fang XF, Cui YW, Li YX, et al. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis* [J]. *Nat Plants*, 2015, 1: 15075.
- [10] Hajheidari M, Farrona S, Huettel B, et al. CDKF; 1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (4): 1626-1642.
- [11] Fukudome A, Fukuhara T. Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis [J]. *J Plant Res*, 2017, 130 (1): 33-44.
- [12] Yang X, Ren WQ, Zhao QX, et al. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (19): 12224-12236.
- [13] Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, et al. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (25): 8795-8800.
- [14] Yang ZY, Ebright YW, Yu B, et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (2): 667-675.
- [15] Huang Y, Ji LJ, Huang QC, et al. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1 [J].

- Nature, 2009, 461 (7265) : 823-827.
- [16] Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, et al. *In vitro* assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90 [J] . Mol Cell, 2010, 39 (2) : 282-291.
 - [17] Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis* [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (10) : 3691-3696.
 - [18] Bologna NG, Iselin R, Abriata LA, et al. Nucleo-cytosolic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway [J] . Mol Cell, 2018, 69 (4) : 709-719. e5.
 - [19] Chen XM. microRNA biogenesis and function in plants [J] . FEBS Lett, 2005, 579 (26) : 5923-5931.
 - [20] Li SB, Liu L, Zhuang XH, et al. microRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis* [J] . Cell, 2013, 153 (3) : 562-574.
 - [21] Yu Y, Jia TR, Chen XM. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs [J] . New Phytol, 2017, 216 (4) : 1002-1017.
 - [22] Kang T, Yu CY, Liu Y, et al. Subtly manipulated expression of ZmmiR156 in tobacco improves drought and salt tolerance without changing the architecture of transgenic plants [J] . Front Plant Sci, 2020, 10 : 1664.
 - [23] López-Galiano MJ, García-Robles I, González-Hernández AI, et al. Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress [J] . Plants (Basel) , 2019, 8 (7) : 201.
 - [24] Cui LG, Shan JX, Shi M, et al. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants [J] . Plant J, 2014, 80 (6) : 1108-1117.
 - [25] Feyissa BA, Arshad M, Gruber MY, et al. The interplay between miR156/SPL13 and DFR/WD40-1 regulate drought tolerance in alfalfa [J] . BMC Plant Biol, 2019, 19 : 434.
 - [26] Wang YM, Liu WW, Wang XW, et al. MiR156 regulates anthocyanin biosynthesis through SPL targets and other microRNAs in poplar [J] . Hortic Res, 2020, 7 : 118.
 - [27] Liu X, Dong XF, Liu ZH, et al. Repression of ARF10 by microRNA160 plays an important role in the mediation of leaf water loss [J] . Plant Mol Biol, 2016, 92 (3) : 313-336.
 - [28] Yuan WY, Suo JQ, et al. The barley miR393 has multiple roles in regulation of seedling growth, stomatal density, and drought stress tolerance [J] . Plant Physiol Biochem, 2019, 142 : 303-311.
 - [29] Zhao JM, Yuan SR, Zhou M, et al. Transgenic creeping bentgrass overexpressing *Osa-miR393a* exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance [J] . Plant Biotechnol J, 2019, 17 (1) : 233-251.
 - [30] Visentin I, Pagliarani C, Deva E, et al. A novel strigolactone-miR156 module controls stomatal behaviour during drought recovery [J] . Plant Cell Environ, 2020, 43 (7) : 1613-1624.
 - [31] Zhou YG, Liu WC, Li XW, et al. Integration of sRNA, degradome, transcriptome analysis and functional investigation reveals gma-miR398c negatively regulates drought tolerance via GmCSDs and GmCCS in transgenic *Arabidopsis* and soybean [J] . BMC Plant Biol, 2020, 20 (1) : 190.
 - [32] Kinoshita N, Wang H, Kasahara H, et al. IAA-*Ala* Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress [J] . Plant Cell, 2012, 24 (9) : 3590-3602.
 - [33] Yang TX, Wang YY, et al. The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in *Arabidopsis* [J] . Sci Rep, 2019, 9 (1) : 2832.
 - [34] Hang N, Shi TR, Liu YR, et al. Overexpression of Os-microRNA408 enhances drought tolerance in perennial ryegrass [J] . Physiol Plant, 2021, 172 (2) : 733-747.
 - [35] Song JB, Gao S, Sun D, et al. miR394 and LCR are involved in *Arabidopsis* salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner [J] . BMC Plant Biol, 2013, 13 : 210.
 - [36] Guo XR, Niu JF, et al. Heterologous expression of *Salvia miltiorrhiza* microRNA408 enhances tolerance to salt stress in *Nicotiana benthamiana* [J] . Int J Mol Sci, 2018, 19 (12) : 3985.
 - [37] Liu YR, Li DY, Yan JP, et al. MiR319 mediated salt tolerance by ethylene [J] . Plant Biotechnol J, 2019, 17 (12) : 2370-2383.
 - [38] Yuan SR, Li ZG, Li DY, et al. Constitutive expression of rice microRNA528 alters plant development and enhances tolerance to salinity stress and nitrogen starvation in creeping bentgrass [J] . Plant Physiol, 2015, 169 (1) : 576-593.
 - [39] Yuan SR, Zhao JM, Li ZG, et al. microRNA396-mediated alteration in plant development and salinity stress response in creeping bentgrass [J] . Hortic Res, 2019, 6 : 48.
 - [40] Ma Y, Xue H, Zhang F, et al. The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression [J] . Plant Biotechnol J, 2021, 19 (2) : 311-323.
 - [41] Wang ST, Sun XL, Hoshino Y, et al. microRNA319 positively

- regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3): e91357.
- [42] Bustamante A, Marques MC, Sanz-Carbonell A, et al. Alternative processing of its precursor is related to miR319 decreasing in melon plants exposed to cold [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 15538.
- [43] Shi XP, Jiang FL, Wen JQ, et al. Overexpression of *Solanum habrochaites* microRNA319d (Sha-miR319d) confers chilling and heat stress tolerance in tomato (*S. lycopersicum*) [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19 (1): 214.
- [44] Tang W, Thompson WA. OsmiR528 enhances cold stress tolerance by repressing expression of stress response-related transcription factor genes in plant cells [J]. *Curr Genomics*, 2019, 20 (2): 100-114.
- [45] Zhu H, Chen CJ, Zeng J, et al. microRNA528, a hub regulator modulating ROS homeostasis via targeting of a diverse set of genes encoding copper-containing proteins in monocots [J]. *New Phytol*, 2020, 225 (1): 385-399.
- [46] Zhou MQ, Tang W. microRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells [J]. *Mol Genet Genomics*, 2019, 294 (2): 379-393.
- [47] Matthews C, Arshad M, Hannoufa A. Alfalfa response to heat stress is modulated by microRNA156 [J]. *Physiol Plant*, 2019, 165 (4): 830-842.
- [48] Arshad M, Puri A, Simkovich AJ, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of alfalfa in response to microRNA156 under high temperature [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 758.
- [49] Wang Y, Sun FL, Cao H, et al. TamiR159 directed wheat TaGAMYB cleavage and its involvement in anther development and heat response [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): e48445.
- [50] Ahmed W, Xia YS, Zhang H, et al. Identification of conserved and novel miRNAs responsive to heat stress in flowering Chinese cabbage using high-throughput sequencing [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 14922.
- [51] Ding YH, Ma YZ, et al. microRNAs involved in auxin signalling modulate male sterility under high-temperature stress in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Plant J*, 2017, 91 (6): 977-994.
- [52] Li LJ, Li Q, Davis KE, et al. Response of root growth and development to nitrogen and potassium deficiency as well as microRNA-mediated mechanism in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 695234.
- [53] Lei KJ, Lin YM, Ren J, et al. Modulation of the phosphate-deficient responses by microRNA156 and its targeted *Squamosa* promoter binding protein-like 3 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57 (1): 192-203.
- [54] Hu B, Wang W, Deng K, et al. microRNA399 is involved in multiple nutrient starvation responses in rice [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 188.
- [55] Du QG, Wang K, Zou C, et al. The PILNCR1-miR399 regulatory module is important for low phosphate tolerance in maize [J]. *Plant Physiol*, 2018, 177 (4): 1743-1753.
- [56] Yuan N, Yuan SR, Li ZG, et al. Heterologous expression of a rice miR395 gene in *Nicotiana tabacum* impairs sulfate homeostasis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28791.
- [57] Li LH, Yi HL, Xue MZ, et al. miR398 and miR395 are involved in response to SO₂ stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ecotoxicology*, 2017, 26 (9): 1181-1187.
- [58] Meng JG, Zhang XD, Tan SK, et al. Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP 1 mediated by miR167 in *Brassica napus* [J]. *Biomaterials*, 2017, 30 (6): 917-931.
- [59] Zhang L, Ding H, Jiang HL, et al. Regulation of cadmium tolerance and accumulation by miR156 in *Arabidopsis* [J]. *Chemosphere*, 2020, 242: 125168.
- [60] Bai B, Bian HW, Zeng ZH, et al. miR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58 (3): 426-439.
- [61] Leng XP, et al. Ectopic expression of CSD1 and CSD2 targeting genes of miR398 in grapevine is associated with oxidative stress tolerance [J]. *Funct Integr Genomics*, 2017, 17 (6): 697-710.
- [62] Caruana JC, Dhar N, Raina R. Overexpression of *Arabidopsis* microRNA167 induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets ARF₆ and ARF₈ [J]. *Plant Direct*, 2020, 4 (9): e00270.
- [63] Hanemian M, Barlet X, Sorin C, et al. *Arabidopsis* CLAVATA1 and CLAVATA2 receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a miR169-dependent pathway [J]. *New Phytol*, 2016, 211 (2): 502-515.
- [64] Li Y, Zhao SL, Li JL, et al. *Osa*-miR169 negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Front*

- Plant Sci, 2017, 8 : 2.
- [65] Song S, Xu Y, Huang DM, et al. Identification and characterization of miRNA169 family members in banana (*Musa acuminata* L.) that respond to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infection in banana cultivars [J]. PeerJ, 2018, 6 : e6209.
- [66] Lee MH, Jeon HS, Kim HG, et al. An *Arabidopsis* NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164 [J]. New Phytol, 2017, 214 (1) : 343-360.
- [67] Wang Z, Xia Y, Lin S, et al. *Osa*-miR164a targets OsNAC60 and negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Plant J, 2018 : 2018 May 18.
- [68] Hu G, Lei Y, Liu JF, et al. The ghr-miR164 and GhNAC100 modulate cotton plant resistance against *Verticillium Dahlia* [J]. Plant Sci, 2020, 293 : 110438.
- [69] Tomkowiak A, Jędrzejewski T, Sychała J, et al. Analysis of miRNA expression associated with the Lr46 gene responsible for *APR* resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Appl Genet, 2020, 61 (4) : 503-511.
- [70] Chen SS, Wu JD, Zhang YF, et al. Genome-wide analysis of coding and non-coding RNA reveals a conserved miR164-NAC-mRNA regulatory pathway for disease defense in *Populus* [J]. Front Genet, 2021, 12 : 668940.
- [71] Zhao WC, Li ZL, Fan JW, et al. Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato [J]. J Exp Bot, 2015, 66 (15) : 4653-4667.
- [72] Zhang X, Bao YL, Shan DQ, et al. *Magnaporthe oryzae* induces the expression of a microRNA to suppress the immune response in rice [J]. Plant Physiol, 2018, 177 (1) : 352-368.
- [73] Fan D, Ran LY, Hu J, et al. miR319a/TCP module and DELLA protein regulate trichome initiation synergistically and improve insect defenses in *Populus tomentosa* [J]. New Phytol, 2020, 227 (3) : 867-883.
- [74] Chand SK, Nanda S, Joshi RK. Regulation of miR394 in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) infection in garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Front Plant Sci, 2016, 7 : 258.
- [75] Tian X, Song LP, Wang Y, et al. miR394 acts as a negative regulator of *Arabidopsis* resistance to *B. cinerea* infection by targeting LCR [J]. Front Plant Sci, 2018, 9 : 903.
- [76] Zhang YY, Hong YH, Liu YR, et al. Function identification of miR394 in tomato resistance to *Phytophthora infestans* [J]. Plant Cell Rep, 2021, 40 (10) : 1831-1844.
- [77] Soto-Suárez M, Baldrich P, et al. The *Arabidopsis* m mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens [J]. Sci Rep, 2017, 7 : 44898.
- [78] Chandran V, Wang H, Gao F, et al. miR396- OsGRFs module balances growth and rice blast disease-resistance [J]. Front Plant Sci, 2019, 9 : 1999.
- [79] Dai ZY, Tan J, Zhou C, et al. The OsmiR396-OsGRF8-OsF3H-flavonoid pathway mediates resistance to the brown planthopper in rice (*Oryza sativa*) [J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17 (8) : 1657-1669.
- [80] Zhang QL, Li Y, Zhang Y, et al. Md-miR156ab and Md-miR395 target WRKY transcription factors to influence apple resistance to leaf spot disease [J]. Front Plant Sci, 2017, 8 : 526.
- [81] Wu JG, et al. ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice [J]. Nat Plants, 2017, 3 : 16203.
- [82] Yao SZ, Yang ZR, Yang RX, et al. Transcriptional regulation of miR528 by OsSPL9 orchestrates antiviral response in rice [J]. Mol Plant, 2019, 12 (8) : 1114-1122.
- [83] Ding D, Zhang LF, Wang H, et al. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots [J]. Ann Bot, 2009, 103 (1) : 29-38.
- [84] Gentile A, Dias LI, Mattos RS, et al. microRNAs and drought responses in sugarcane [J]. Front Plant Sci, 2015, 6 : 58.
- [85] Khraiweh B, Zhu JK, Zhu JH. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819 (2) : 137-148.
- [86] Gubler F, Raventos D, Keys M, et al. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone [J]. Plant J, 1999, 17 (1) : 1-9.
- [87] Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, et al. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB [J]. Plant Cell, 2009, 21 (5) : 1453-1472.
- [88] Alonso-Peral MM, et al. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2010, 154 (2) : 757-771.