

MicroRNA 调节豆科作物营养胁迫响应的研究进展

徐锋, 王金祥*

(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 华南农业大学农学院, 广州 510642)

摘要: micorRNA (miRNA) 是一类长度为 20~24 个核苷酸的非编码小 RNA (small RNA, sRNA), 在植物生长发育、生物和非生物胁迫响应方面起十分重要作用。越来越多的证据表明, miRNA 在植物适应养分胁迫方面起重要的调节作用。豆科植物是一类具有生物固氮能力的植物, 为人类提供蛋白和食用油, 显然土壤养分胁迫会抑制豆科作物生长发育而降低产量。过去数十年对于 miRNA 介导模式植物拟南芥和水稻养分胁迫响应的研究较多, 但近年来有关豆科作物养分胁迫相关的 miRNA 报道在增加。近年研究结果表明, miRNA 通过对靶基因的调节在豆科植物适应营养胁迫中起关键作用, 如感受外界养分状态的改变及维持体内养分的动态平衡。本文综述了近年来 miRNA 介导豆科作物适应养分胁迫的研究进展, 主要对磷、氮、硫、铁、铜、钙等养分亏缺或毒害反应的调控, 讨论了 miRNA 调节豆科作物适应养分胁迫的机理, 并对今后豆科作物 miRNA 的研究做出了展望。

关键词: miRNA; 营养胁迫; 豆科作物

中图分类号: Q945.12; S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2016)01-0236-09

Advances on the study of microRNA-mediated responses to nutrient stress in legume crops

XU Feng, WANG Jin-xiang*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources/
College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is one kind of non-coding small RNA (sRNA), and has 20-24 nucleotides in length, and plays important roles in plant growth development and in response to biotic and abiotic stress. Many evidences have shown that miRNA is crucial modulator in adaptations of plant to nutrient stress. Legume plants could fix nitrogen from atmosphere and provide proteins as well as edible oil for human being. Nutrient stresses in soils obviously inhibit legume growth and development, and result in a decrease in yield. In past decades, most studies on mediation roles of miRNA in responses to nutrient stresses in *Arabidopsis* and rice have been characterized, respectively. However, recent studies have witnessed emerging reports on the functions of miRNA in response to nutrient stress in legumes, and revealed crucial roles of miRNAs in adaptations of legumes to various adverse nutrient conditions via modulating activity of target genes such as sensing alteration of nutrient status and fine-tuning nutrient homeostasis. In this review, the regulation role of miRNAs in response to different nutrient stresses was reviewed, especially in response to the stresses from phosphorus (P), nitrogen (N), sulphur (S), iron (Fe), copper (Cu) deficiencies and calcium (Ca) toxicity, and the mechanisms of miRNAs involved in the adaptations of legume to different kinds of nutrient stress were discussed, and the perspective of research on nutrient-related miRNA in legume was outlined in the near future.

Key word: miRNA; nutrient stress; legume crops

收稿日期: 2014-09-02 接受日期: 2014-10-10 网络出版日期: 2015-07-02

基金项目: 农业部转基因专项(2014ZX0800928B); 科技部重大基础研究专项基金 973 项目(2011CB100301)资助。

作者简介: 徐锋(1986—), 男, 广东云浮人, 博士研究生, 主要从事植物营养分子生物学方面的研究。E-mail: june92634@126.com

* 通信作者 E-mail: jinxiang@scau.edu.cn

豆科作物,如大豆(*Glycine max*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、鹰嘴豆(*Cicerarietinum*)、花生(*Arachis hypogea*)及紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是世界范围内广泛种植的重要粮油与饲料作物,为人类提供植物蛋白。随着世界人口的增加,人类对植物蛋白的需求也越来越大。据资料显示,豆科作物的产量约占世界初级农产品的三分之一^[1]。值得关注的是,豆科作物与根瘤菌形成共生体,固定大气中的氮,在生态系统氮循环过程中起重要作用^[2]。此外,豆科作物与菌根真菌共生,改善土壤磷营养的状态^[3]。因此,豆科作物也是环境友好型作物。

近年来,越来越多的研究证明,非编码小分子 RNA(non-coding small RNA, sRNA)在植物的生长发育各阶段起关键的调控作用^[4-6]。同样在豆科植物中,有较多的研究报道了 sRNA 在生长发育,逆境响应,以及与根瘤菌、菌根菌共生过程中起重要作用^[7-8]。MicroRNA(miRNA)是长度为 20~24 个核苷酸的单链非编码 sRNA。miRNA 通过对靶基因 mRNA 进行切割,或者抑制 mRNA 的翻译对靶基因进行转录后调控,最终调节植物生长发育及生物和非生物胁迫响应。

1 miRNA 的形成与作用机理

在植物中,真正能降解 mRNA 的是成熟的 miRNA,其形成需要经过复杂的生物合成过程^[9]。miRNA 基因在 II 型 RNA 聚合酶(RNA Polymerase II,

Pol II)催化下进行转录^[10],其产物是包含成熟 miRNA 片段的发夹结构的前体,称为初级 miRNA(primary miRNA, pri-miRNA),核糖核酸酶 DICER-LIKE 1(DCL1)、锌指蛋白 SERRATE(SE)以及双链结合蛋白 HYPOASTIC LEAVES 1(HYL1)对 pri-miRNA 进行剪切加工,生成 miRNA 前体(precursor miRNA, pre-miRNA)^[11]; DCL1 和 HYL1 对其再进行加工生成 miRNA 双链片段(miRNA/miRNA* duplex)^[12-13]。接着在甲基化酶 HUA ENHANCER 1(HEN1)的作用下,将双链 miRNA 两端的羟基甲基化而避免被降解^[14]。最后在运转蛋白 HASTY(HST)帮助下将 miRNA/miRNA* 从细胞核运送至细胞质中^[15]。成熟 miRNA 的其中一条链装载到 Argonaute1(AGO1)蛋白上形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)^[16],RISC 结合至靶基因的 mRNA 上,在复合体中被 miRNA 识别的 mRNA 将被降解或因 miRNA 结合在 3'非翻译区(UTR)而抑制其翻译水平^[17](图 1)。近年的研究发现,植物中尚有其他蛋白参与 miRNA 合成。如 DAWDLE(DDL)蛋白与 DCL1 交互作用,稳定 pri-miRNA 转录水平^[18];拟南芥一个富含脯氨酸蛋白逆境响应基因 *SICKLE(SIC)* 也参与 miRNA 的生物合成^[19]; STABILIZED 1(STA1)蛋白能直接作用于 pri-miRNA 的剪切,从而间接调控 DCL1 的转录水平^[20]; RNA 结合蛋白 MOS2 通过增加 miRNA 剪切复合体对 pri-miRNA 的收集,促进 pri-miRNA 的加工^[21]。

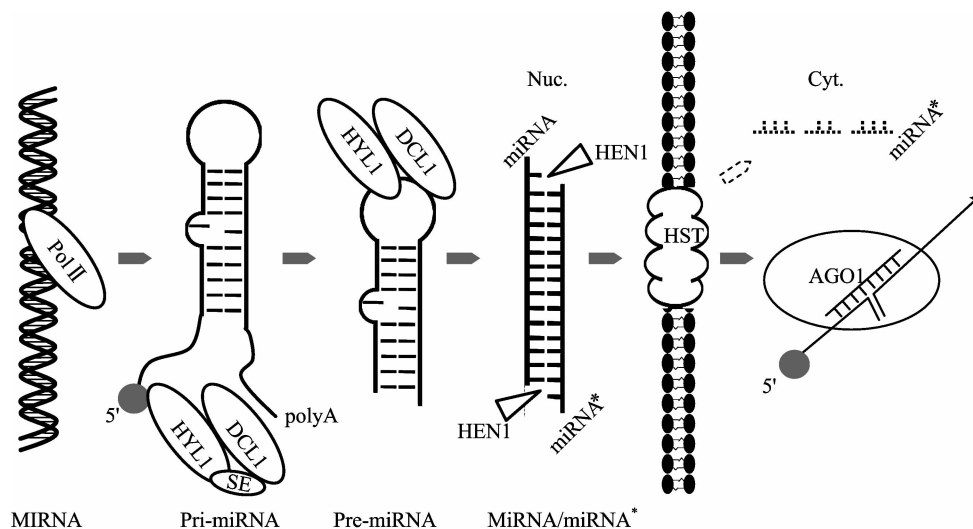


图 1 植物 miRNAs 生成示意图

Fig. 1 Biogenesis of plant miRNAs

[注(Note): Nuc.—细胞核 Nucleus; Cyt.—细胞质 Cytoplasm; MIRNA—MIRNA 基因 MIRNA genes; Pri-miRNA—初生 miRNA Primary miRNA; Pre-miRNA—miRNA 前体 Precursor miRNA; MiRNA/miRNA*—miRNA 双链 miRNA/miRNA* duplex; Pol II—RNA 聚合酶 II RNA Polymerase II; DCL1—核糖核酸酶 DICER-LIKE 1; HYL1—双链结合蛋白 HYPOASTIC LEAVES 1; SE—锌指蛋白 SERRATE; HEN1—甲基化酶 HUA ENHANCER 1; HST—运转蛋白 HASTY; AGO1—ARGONAUTE1 蛋白 ARGONAUTE 1.

从图 1 可以看出, DCL 蛋白和 AGO 蛋白在 miRNA 形成过程中起重要作用。以往研究表明, 大豆基因组含有 6 个 *DCL* 基因 (*GmDCL1a*、*GmDCL1b*、*GmDCL2a*、*GmDCL2b*、*GmDCL3a*、*GmDCL4a*)^[22], 但在苜蓿基因组, 仅存在各一个拷贝的 *DCL1*、*DCL2* 和 *DCL3* 基因^[23-24]。生物信息学分析表明, 大豆、苜蓿、百脉根基因组分别含有 21、12 和 9 个 *AGO* 基因^[25]。这些研究证明, 豆科植物大豆、苜蓿、百脉根等基因组均存在拟南芥基因组与 miRNA 生物合成和加工有关的同源基因, 因此豆科植物 miRNA 形成机理可能与拟南芥等模式植物相似, 但还有待开展深入研究。

2 miRNA 调节植物生长发育及对养分逆境适应性反应

miRNA 通过对靶基因的调节影响植物生长发育。Nikovics 等^[26]研究发现, miR164a 能对 *CUC2g* 的表达进行调节, 抑制拟南芥锯齿状叶片的产生。Vidal 等^[27]报道了 miR393 参与了拟南芥根系构型对不同氮水平的响应, miR393 的靶基因编码一个生长素受体 AFB3, 而 AFB3 特异调控氮素对根系构型的塑造。最新的研究还指出, miR393 还参与了拟南芥叶片的发育^[28], miR393 抑制 TIR1/AFB2 生长素受体基因的表达, 从而调控植物对生长素的感应以及叶片发育相关部位的生长素感应。

miRNA 在植物的营养胁迫响应中同样扮演重要角色。miR395 参与调节拟南芥体内硫酸盐的累积与分配^[29]。miR395 的靶基因包含了两个基因家族, 分别是由 *APS* 基因编码的 ATP 硫酸化酶以及硫酸盐转运子 *SULTR2; 1*。在过量表达 miR395 的拟南芥体内, 这两个基因家族的表达受到强烈的抑制, 导致地上部硫高度累积。

miR399 是一个特异受低磷诱导表达的 miRNA, 其靶基因是 E2 结合酶^[30-31]。前人的研究发现, 拟南芥 *pho2* 突变体在叶部积累大量磷, 但对根部没有影响^[32-33]。对 *PHO2* 基因进行图位克隆后发现其编码 E2 结合酶, 并受 miR399 负调控, 高磷条件下 *PHO2* 可能抑制下游一些磷响应的基因如 *Ph1; 8* 等表达^[34]。最近的研究证实: *PHO2* 在内质网中与磷转运蛋白 *PHT1* 相互作用, 调控磷转运蛋白的泛素化而调节拟南芥磷吸收^[35]。拟南芥 miR827 也是一个受低磷特异诱导上调表达的 miRNA, 其靶基因为 *NLA* (*Nitrogen Limitation Adaptation*), *NLA* 蛋白 C 端含有一个具 E3 连接酶

活性的 RING 结合域^[36-39]。最近的实验证明, *NLA* 蛋白与磷转运蛋白 *PHT1* 在细胞膜上互作, 通过招募 *PHO2* 来控制拟南芥磷转运子的泛素化而调节磷转运子的降解, 从而调控植株磷吸收及磷平衡^[40-41]。Abdel-Ghany 等^[42]的研究指出, 拟南芥中 miR397、miR408 和 miR857 通过下调铜蛋白的表达从而适应低铜胁迫, 同时也提出了 miRNA 通过抑制植物中非重要蛋白的表达来节省体内的铜, 将之供应到更需要的组织, 使植物适应低铜逆境。

目前, 针对 miRNA 参与植物的生长发育及适应逆境的机理在其它模式植物上已经有较深入的研究, 但对豆科植物 miRNA 调控生长发育、生物和非生物胁迫响应机制的研究较少。近年来, 豆科植物大豆 (*Glycine max*), 蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*), 以及百脉根 (*Lotus japonicus*) 等已成为良好的模式植物, 利用高通量测序 (High-throughput sequencing) 技术对豆科植物 sRNA 进行鉴定的研究逐渐增多, 关于豆科植物 miRNA 的研究也越来越多。目前, 在 miRBase (www.mirbase.org) 数据库可检索到 554 个成熟的大豆 miRNA 序列, 756 个蒺藜苜蓿 miRNA 成熟序列, 67 个百脉根成熟 miRNA 序列。

3 miRNA 在豆科植物营养胁迫响应中的功能

3.1 miRNA 在豆科植物磷营养胁迫响应中的功能

磷是植物生长发育所必需的大量元素之一, 在植物的光合反应、呼吸作用和其他生理生化过程中起着重要作用, 是植物完成生命周期不可缺少的元素。但是施入土壤中的磷肥易被表层土壤束缚或以有机磷形态被固定, 成为植物难以利用的磷, 造成土壤有效磷缺乏^[43-44]。因此研究豆科作物适应低磷养分胁迫的机理, 挖掘豆科作物自身对磷的高效吸收利用潜力, 提高豆科作物在低磷条件的产量已成为植物营养研究领域的热点。

越来越多的证据表明, miRNA 在豆科作物养分胁迫响应中起重要作用。在植物中, miR399 是一类保守的受磷特异诱导表达的 miRNA, 其作用机理在拟南芥和水稻中已有较深入的研究^[31, 45]。菜豆 miR399 (*pvu-miR399*) 同样介导磷信号转导。研究发现菜豆中一个与拟南芥基因 *AtPHR1* 同源的 MYB 类转录调控因子编码基因 *PvPHR1*, 受低磷诱导; 而 *pvu-miR399* 受 *PvPHR1* 的正调控, 并抑制泛素结合酶 E2 的表达。这说明菜豆存在与拟南芥一致的

miR399 调控低磷响应信号途径^[46]。此外,基于高密度 miRNA 基因表达芯片技术 (macroarrays), Valdés-López 等^[47] 发现在菜豆中有 10 个 miRNAs (miR157、miR160、miR165、miR166、miR169、miR393、pvu-miR2118、gma-miR1524、gma-1526、gma-miR1532) 分别在叶部、根部与根瘤不同程度地受低磷调控。在磷缺乏的情况下,与未受侵染的相比,菌根菌侵染的蒺藜苜蓿根部 miR399 表达显著上调,而其靶基因 *MtPHO2* 的表达显著下调^[8]。Ramírez 等^[48] 比较了低磷耐受型菜豆 BAT477 与低磷敏感型菜豆 DOR364 在磷亏缺情况下的表现,BAT477 比 DOR364 积累更多的磷以及有更高生物量的根系。通过研究发现,在两个不同基因型菜豆中,pvu-miR399 靶定 *PvPHO2* 的位点均在 5'UTR,并且有 5 个靶定位点。但除了 4 个靶定位点的序列一致外,有 1 个靶定位点在两个基因型中出现了差异;相较于 DOR364 的完全匹配,BAT477 在此位点上有 3 个碱基不匹配,导致 miR399 对 BAT47 *PHO2* 基因转录本切割效率下降。暗示 pvu-miR399 靶定效率的差异可能决定两个基因型适应低磷胁迫的差异。拟南芥 *IPS1* 基因是一类非编码 RNA 基因,受低磷诱导表达,*IPS1* 基因的核心区域与 miR399 的成熟序列高度互补配对^[49]。拟南芥 *IPS1* 基因的 mRNA 能作为一种靶基因模拟物 (target mimics) 而诱捕 miR399,从而限制 miR399 对 *PHO2* 的剪切,维持拟南芥在低磷条件下体内磷营养的动态平衡^[50]。在蒺藜苜蓿、大豆等豆科植物中也发现了与拟南芥 *IPS1* 高度同源的基因家族^[51-52],暗示豆科植物中也存在与拟南芥相类似的机制,即通过植物内源的靶基因模拟物来下调 miRNA 的介导作用,使植物保持体内磷动态稳定。

利用深度测序 (deep sequencing) 技术, Zhu 等^[53] 鉴定了白羽扇豆中不同部位的磷响应 miRNA,并发现了共有属于 35 个 miRNA 基因家族的 167 个 miRNA 受低磷的明显影响。35 个基因家族中,17 个在根部表达上调,7 个表达下调;茎部有 9 个上调,6 个下调;而在叶部则有 10 个上调,12 个下调。57 个大豆 miRNA 的表达不同程度地受低磷胁迫影响^[54],在低磷处理的大豆叶部与根部的 sRNA 文库中鉴定出属于 35 个 miRNA 基因家族的 60 个已知 miRNAs 与 16 个新 miRNAs^[55]。2013 年,我们构建不同磷水平处理 (磷充足与磷缺乏) 大豆叶部或根部的 sRNA 文库,进行深度测序;结合生物信息分析手段鉴定出 25 个 miRNAs 受低磷诱导,11 个

miRNAs 受低磷抑制^[52];此外我们通过降解组测序和 RACE 技术确定大豆 miR399 的靶基因是 *PHO2*^[52],与拟南芥 *PHO2* 高度同源,也可能编码 E2 结合酶。结合过去菜豆的研究,我们推测 miR399/*PHO2* 模块在豆科作物中作用是保守的,可能调节植物对低磷胁迫响应。

3.2 miRNA 在豆科植物氮营养胁迫中的功能

氮元素是植物最重要的大量营养元素,是氨基酸、蛋白质、核酸、辅酶以及无数次级代谢物的主要组成成分。植物主要通过根系以硝态氮 (NO_3^-) 与铵态氮 (NH_4^+) 的形式来吸收氮。

拟南芥 miR167 的靶基因 *ARF8* 编码转录因子,作为生长素信号通路成员促进侧根产生^[56]。低氮条件下,miR167 的表达下调,而 *ARF8* 表达上调,因此促进拟南芥侧根生长而增加根系吸收氮的能力^[56]。Vidal 等^[27] 报道,低氮条件上调 miR393 的表达,从而抑制 *AFB3* 的表达和拟南芥根系对生长素的敏感性,导致主根生长受抑制而侧根生长受促进,说明拟南芥通过 miR393/*AFB3* 的通路调节根构型的改变以适应低氮胁迫。miR169 是植物中十分保守的 miRNA,受低氮强烈下调,有些 miR169 成员的表达量在低磷的条件下也会减少^[38-39]。miR169 的靶基因在拟南芥和大部分植物中均属于 *HAP2* 基因家族,编码一类称作 NF-YA 亚基的转录调控因子^[39]。研究证明,干旱胁迫降低 miR169 的表达,从而增强靶基因 *NF-YA5* 表达,增加拟南芥对干旱的适应能力^[57],说明 miR169 可能在氮胁迫和干旱胁迫交互响应方面起重要作用。

利用微阵列芯片技术,发现菜豆 miR169 的表达同时受到缺磷、缺氮、缺铁的抑制^[47]。Wang 等^[58] 通过高通量测序,对低氮敏感型 No. 84-70 与低氮耐受型 No. 116 大豆在缺氮情况下的 miRNA 变化进行鉴定,一共鉴定出 362 个已知的 miRNAs 与 158 个新的 miRNAs。分析发现 150 个已知 miRNAs 与 2 个新的 miRNAs 受低氮的调控,暗示这些 miRNA 在大豆适应低氮胁迫中起重要的作用。揭示大豆 miR169 成员水平受低氮下调,也有成员受低磷下调^[52],表明 miR169 是调节氮磷养分平衡的重要成员。

根瘤菌能固定大气中氮气从而改善豆科作物氮营养。已有的研究证明,豆科作物 miRNA 在调节根瘤发育方面也起重要作用。如 miR169 在豆科植物根瘤发育的过程中起重要作用。在蒺藜苜蓿中过表达 miR169 或者敲除靶基因 *HAP2-1*,均导致根瘤的

不正常发育^[59]。同样在蒺藜苜蓿中,miR166 可以通过调节一个编码 HD-ZIPⅢ 的转录调控因子来控制根瘤菌的共生^[60]。有研究者从蒺藜苜蓿成熟根瘤和根尖的 sRNA 文库中鉴定了 36 个保守的 miRNAs 与 100 个新的候选 miRNAs,发现 miR2586 与 miR107 在根瘤分生组织中累积^[61]。miR156 调控 miR172 的表达,而 miR172 控制一个 AP2 类的转录因子的表达水平,此转录因子可能直接或间接控制非共生相关的血红蛋白的表达,此类血红蛋白可能是调节根瘤发育所必需的^[62]。与此一致的是,过表达 miR172 能促进转基因大豆毛根的根瘤数目,促进共生有关的豆血红蛋白(leghemoglobin)和非共生相关的血红蛋白(hemoglobin)蛋白基因的表达,且转基因大豆根瘤中固氮酶活性(nitrogenase)比较高,说明 miR172 是根瘤发育的正调控因子。miR172 在菜豆根瘤中有较高的表达量,在锰(manganese, Mn)毒害生长条件下,菜豆根瘤中的 miR172 表达增加,而靶基因 AP2 表达下降,暗示 miR172 在根瘤响应锰毒方面起重要作用^[47]。大豆 miR160 也参与生长素调节根瘤发育。拟南芥 miR160 的靶基因为生长素响应因子基因家族成员 ARF10/ARF16/ARF17^[63-64],过表达大豆 miR160 的毛根对生长素高度敏感,而对细胞分裂素不敏感,由此抑制了大豆根瘤的发育^[65]。Li 等^[66]在大豆中异位过表达 miR482, miR1512, miR1515 能增加大豆根瘤的结瘤数。百脉根 miR171 通过调节靶基因 NSP2 来控制根瘤菌的侵染。miR397 与它的靶基因——一个编码漆酶铜蛋白基因家族的成员可调节根瘤的固氮能力^[67]。

Subramanian 等^[68]在 2008 年鉴定出 35 个 miRNAs 可能参与大豆早期根瘤的发育。Wang 等^[69]从大豆成熟根瘤中鉴定了 22 个已知 miRNAs 与 4 个新的 miRNAs,发现了 11 个 miRNA 基因家族参与根瘤后期发育。最近研究发现,在正常与盐害生长条件下的大豆成熟根瘤中,有 104 个 miRNAs 表达水平受盐害的强烈影响,这暗示这些 miRNA 在大豆氮营养与盐害的信号互作方面起作用^[70]。

3.3 miRNA 在豆科植物其他营养胁迫中的功能

3.3.1 硫响应 miRNA 在低硫胁迫条件下,拟南芥 miR395 表达水平增加^[71]。APS1、APS3 和 APS4 以及硫转运子基因(SULTR2; 1)是 miR395 的靶基因。miR395 主要在韧皮部伴胞表达^[71],而 SLIM1 是 EIL 类转录调节因子,它在低硫条件下促进 miR395 的表达。因此 SLIM1 是乙烯信号和硫营养信号互作

的节点^[72]。利用深度测序的技术手段,在大豆与菜豆中也发现了 miR395^[73-75],暗示豆科作物 miR395 也可能调控植物适应低硫胁迫,但需要更深入研究。

3.3.2 铁响应 miRNA 通过微阵列芯片和 Northern 杂交,菜豆 miR167、miR397、miR398 和 miR408 表达水平对铁亏缺作出响应,如铁饥饿抑制 miR397 和 miR398 表达^[76],而 miR397 和 miR398 的靶基因是编码含铜蛋白基因。这说明铁营养和铜营养平衡间的联系。此外,菜豆中 pvu-miR1511、gma-miR1513、gma-miR1515 和 gma-miR1516 在缺铁的情况下强烈表达,说明这些 miRNA 是菜豆铁营养胁迫响应的重要调节者^[47]。菜豆中 miR398 与 miR408 在氮缺乏或铁缺乏的条件下,表达量下调,同时菜豆体内的铜含量增加^[47]。

3.3.3 铜响应 miRNA 近年来的研究表明,拟南芥 miR397、miR398、miR408 以及 miR857 通过下调编码含铜蛋白基因的表达来适应低铜胁迫^[77]。转录调控因子 AtSPL7 (SQUAMOSA promoter binding protein-like 7) 调节 miR397、miR398、miR408 和 miR857 的表达,而 AtSPL7 可直接结合 miR398 基因启动子的 GTAC 元件^[78]。以上研究说明,miRNA 基因在转录水平上也受到严格调控。深度测序结果表明,大豆基因组存在 miR398、miR397 以及 miR408 等 miRNA 基因^[52]。至于豆科作物是否存在类似的调控机制还有待深入研究。

3.3.4 其他养分胁迫或重金属响应 miRNA Zeng 等^[79]以野生大豆为材料,通过深度测序,鉴定了铝(aluminum)毒胁迫响应的 miRNAs,发现 miR396、miR390、miR1510a-5p 受铝毒上调,而 miR156、miR164 与 miR169 则受铝毒下调。蒺藜苜蓿 iR160、miR319、miR396、miR1507、miR1510a、miR390 受铝毒下调表达^[80]。

在高锰胁迫下,11 个菜豆 miRNAs 在根瘤强烈表达,11 个在根部或叶部受显著抑制^[47]。此外,蒺藜苜蓿 miR160, miR166, miR319, miR393, miR398 对汞(Hg),钙(Ca)及铝胁迫均有响应^[81]。

图 2 总结了近年来豆科植物养分胁迫响应 miRNA 及其靶基因。需要指出的是,虽然上述研究揭示了一些对不同养分胁迫有响应的豆科植物 miRNA,但理解这些 miRNA 和靶基因的功能还需要进行深入细致的研究。

4 展望

虽然豆科作物中存在一些保守的养分胁迫响应

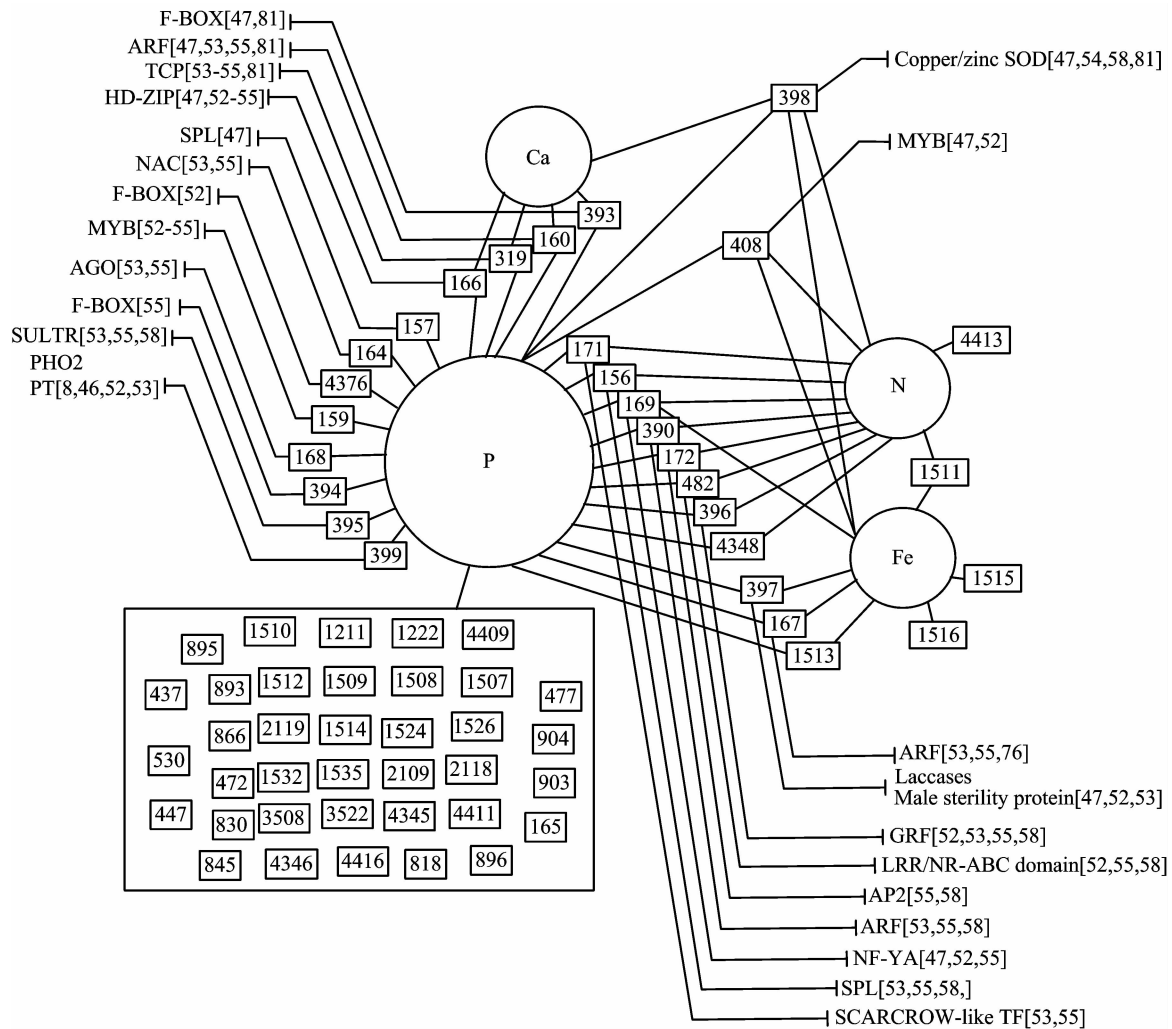


图2 豆科响应养分胁迫的 miRNAs 示意图

Fig. 2 Nutrient stress responsive miRNAs in legume

[注 (Note): 图中圆圈表示养分胁迫, 方框表示 miRNAs, 实线表示诱导, 虚线表示抑制 Circles mean the nutrients stresses, boxes mean miRNAs, full lines mean response and dashed lines mean inhibition. P—缺磷 Phosphorus deficiency; N—缺氮 Nitrogen deficiency; Fe—缺铁 Iron deficiency; Ca—钙胁迫 Calcium toxicity; SULTR—硫转运子 Sulphate transporter; PT—磷转运子 Phosphate transporter; TF—转录因子 Transcription factor.]

miRNA, 但我们对其功能的理解还很肤浅, 因此对豆科作物养分胁迫响应 miRNA 的个体功能研究依然是今后研究的主要方向。如菜豆、大豆等豆科植物中均鉴定出受低磷诱导的保守 miR399, 并且通过实验证明了 miR399 的靶基因也十分保守, 均是编码泛素结合酶的基因 *PHO2*^[46,52]。但 Xu 等^[52]通过生物信息学分析预测并结合 5'RACE 的手段证实大豆磷转运子基因 *GmPT5* 是 miR399 靶基因。这暗示大豆 miR399 参与磷营养胁迫响应的机制可能比拟南芥和水稻更复杂。

需要指出的是, 一些豆科植物特异的 miRNA 调节根瘤的生长发育^[61,66]。但是, 目前对于这些特异的 miRNA 所调控的靶基因功能认识非常肤浅。因

此根瘤菌侵染早期响应的豆科植物根系 miRNA 的功能也应该是今后研究方向之一。

miRNA 基因本身是如何受到调节的还不清楚, 因此对调节豆科作物养分相关 miRNA 表达的转录因子开展深入研究将会加深对 miRNA 功能的理解。靶基因模拟 (Target mimicry) 是近年发现的一种调节 miRNA 活性的现象。拟南芥 *IPS1* 被证明作为 miR399 的拮抗者抑制 miR399 的功能^[50]。还有一些 miRNA 的内源靶基因替身 (target mimics) 已经被发现^[82]。这些现象说明, miRNA 自身既受到转录水平的调控也受到转录后的调节。研究豆科作物 miRNA 的转录调节和转录后调节, 将有助于更进一步的理解 miRNA 的调控网络。一个 miRNA 前体可

以产生几种成熟的 miRNA,这个过程是受什么机制调节还不清楚,因而养分胁迫如何影响 miRNA 的产生量及产生种类值得研究。此外,一个 miRNA 可能对不同的营养胁迫均有响应,如 miR156、miR169、miR171、miR172、miR397、miR398 等受到不同的养分胁迫调控(图 2),暗示豆科作物中响应多种胁迫的 miRNA 可能是养分互作网络的关键节点。显然构建豆科作物 miRNA 调控营养胁迫响应的分子网络,将促进我们对 miRNA 调节养分胁迫响应和营养平衡功能的解析。

可以预期的是,揭示豆科作物养分胁迫响应 miRNA 及其调控网络将会极大促进我们对作物养分高效吸收利用机理的理解,对其中关键 miRNA 及其靶基因进行遗传操作将有可能培养或创制营养高效的豆科作物品种,以减少农业生产中肥料的投入。

参考文献:

- [1] Mantri N, Basker N, Ford R, *et al.* The role of miRNAs in legumes with a focus on abiotic stress response [J]. *The Plant Genome*, 2013, 6(3): 1–14.
- [2] Hirsch A M. Developmental biology of legume nodulation [J]. *New Phytologist*, 1992, 122(2): 211–237.
- [3] Parniske M. *Arbuscularmycorrhiza*: the mother of plant root endosymbioses [J]. *Nature Reviews of Microbiology*, 2008, 6(10): 763–775.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [5] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulation roles in plant [J]. *Annual Reviews of Plant Biology*, 2006, 57: 19–53.
- [6] Zeng H Q, Wang G P, Hu X Y, *et al.* Role of microRNAs in plant responses to nutrient stress [J]. *Plant and Soil*, 2014, 374(1–2): 1005–1021.
- [7] Simon S A, Meyers B C, Sherrier D J. MicroRNAs in the rhizobia legume symbiosis [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1002–1008.
- [8] Branscheid A, Sieh D, Pant B D, *et al.* Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during *arbuscularmycorrhizal* symbiosis [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(7): 915–926.
- [9] Kai Z S, Pasquinelli A E. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs [J]. *Nature Structure and Molecular Biology*, 2010, 17(1): 5–10.
- [10] Lee Y, Kim M J, Han J J, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(20): 4051–4060.
- [11] Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, *et al.* Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(20): 6429–6438.
- [12] Yang L, Liu Z, Lu F, *et al.* SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(6): 841–850.
- [13] Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt D D, *et al.* SERRATE: a new player on the plant microRNA scene [J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(10): 1052–1058.
- [14] Yu B, Yang Z Y, Li J J, *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis [J]. *Science*, 2005, 307(5711): 932–935.
- [15] Park M Y, Wu G, Gonzalez-Sulser A, *et al.* Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102(10): 3691–3696.
- [16] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, *et al.* MicroRNAs in plants [J]. *Genes and Development*, 2002, 16(13): 1616–1626.
- [17] Chapman E J, Carrington J C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(11): 884–896.
- [18] Yu B, Bi L, Zheng B, *et al.* The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIPI in humans act in small RNA biogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(29): 10073–10078.
- [19] Zhan X, Wang B, Li H, *et al.* *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2012, 109(44): 18198–18203.
- [20] Chaabane S B, Liu R, Chinnusamy V, *et al.* STAI, an *Arabidopsis* pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(3): 1984–1997.
- [21] Wu X, Shi Y, Li J, *et al.* A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in *Arabidopsis* [J]. *Cell Research*, 2013, 23(5): 645–657.
- [22] Curtin S J, Kantar M B, Yoon H W, *et al.* Co-expression of soybean Dicer-like genes in response to stress and development [J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2012, 12(4): 671–682.
- [23] Capitão C, Paiva J A, Santos D M, *et al.* In *Medicago truncatula*, water deficit modulates the transcript accumulation of components of small RNA pathways [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 79.
- [24] Young N D, Debellef, Oldroyd G E, *et al.* The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses [J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 520–524.
- [25] Bustos-Sanmamed P, Bazin J, Hartmann C, *et al.* Small RNA pathways and diversity in model legumes: lessons from genomics [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 236.
- [26] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, *et al.* The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 2929–2945.
- [27] Vidal E A, Araus V, Lu C, *et al.* Nitrate-responsive miR393/

- AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2010, 107(9): 4477–4482.
- [28] Si-Ammour A, Windels D, Arn-Bouidoires E, *et al.* miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves [J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 683–691.
- [29] Liang G, Yang F, Yu D. MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2010, 62(6): 1046–1057.
- [30] Fujii H, Chiou T J, Lin S I, *et al.* A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis* [J]. Current Biology, 2005, 15: 2038–2043.
- [31] Chiou T J, Aung K, Lin S I, *et al.* Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18: 412–421.
- [32] Delhaize E, Randall P J. Characterization of a phosphate accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 1995, 107: 207–213.
- [33] Dong B, Rengel Z, Delhaize E. Uptake and translocation of phosphate by *pho2* mutant and wild-type seedlings of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 1998, 205: 251–256.
- [34] Bari R, Pant B D, Stitt M, *et al.* PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants [J]. Plant Physiology, 2006, 141: 988–999.
- [35] Huang T K, Han C L, Lin S I, *et al.* Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots [J]. Plant Cell, 2013, 25(10): 4044–4060.
- [36] Peng M, Bi Y M, Zhu T, *et al.* Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA* [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(6): 775–797.
- [37] Yaeno T, Iba K. BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000 [J]. Plant Physiology, 2008, 148(2): 1032–1041.
- [38] Hsieh L C, Lin S I, Shih A C C, *et al.* Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing [J]. Plant Physiology, 2009, 151(4): 2120–2132.
- [39] 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 Physiology, 2009, 150(3): 1541–1555.
- [40] Lin W Y, Huang T K, Chiou T J. Nitrogen limitation adaptation, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25(10): 4061–4074.
- [41] Park B S, Seo J S, Chua N H. Nitrogen limitation adaptation recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of *Arabidopsis* phosphate homeostasis [J]. Plant Cell, 2014, 26(1): 454–464.
- [42] Abdel-Ghany S E, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic downregulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis* [J]. The Journal of Biology Chemistry, 2008, 283(23): 15932–15945.
- [43] Kochian L V. Plant nutrition: Rooting for more phosphorus [J]. Nature, 2012, 488(7412): 466–467.
- [44] Wang X R, Shen J B, Liao H. Acquisition or utilization, which is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops [J]. Plant Science, 2010, 179(4): 302–306.
- [45] Dai X, Wang Y, Yang A, *et al.* OsMYB2P-1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice [J]. Plant Physiology, 2012, 159(1): 169–183.
- [46] Valdés-López O S, Aenas-Huertero C, Ramírez M *et al.* Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots [J]. Plant, Cell and Environment, 2008, 31(12): 1834–1843.
- [47] Valdés-López O, Yang S S, Aparicio-Fabre R, *et al.* MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity [J]. New Phytologist, 2010, 187(3): 805–818.
- [48] Ramírez M, Flores-Pacheco G, Reyes J L, *et al.* Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA399-mediated *PvPHO2* regulation within the PvPHR1 signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Science, 2013, 14: 8328–8344.
- [49] Martín A C, del Pozo J C, Iglesias J, *et al.* Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2000, 24(5): 559–567.
- [50] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity [J]. Nature Genetics, 2007, 39(8): 1033–1037.
- [51] Burleigh S H, Harrison M J. The down-regulation of *Mt4*-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots [J]. Plant Physiology, 1999, 119(1): 241–248.
- [52] Xu F, Liu Q, Chen L, *et al.* Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 66.
- [53] 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.
- [54] 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.

- [55] Sha A, Chen Y, Ba H, *et al.* Identification of *Glycine Max* MicroRNAs in response to phosphorus deficiency [J]. *Journal of Plant Biology*, 2012, 55(4): 268–280.
- [56] Gifford M L, Dean A, Gutierrez R A, *et al.* Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(2): 803–808.
- [57] Li W X, Oono Y, Zhu J, *et al.* The *Arabidopsis* NF-YA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2238–2251.
- [58] Wang Y, Zhang C, Hao Q, *et al.* Elucidation of miRNAs-mediated responses to low nitrogen stress by deep sequencing of two soybean genotypes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67423.
- [59] Combier J P, Frugier F, De Billy F, *et al.* MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula* [J]. *Genes Development*, 2006, 20(22): 3084–3088.
- [60] Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, *et al.* MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Journal*, 2008, 54(5): 876–887.
- [61] Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, *et al.* Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2780–2796.
- [62] Yan Z, Hossain M S, Wang J, *et al.* miR172 regulates soybean nodulation [J]. *Molecular of Plant-Microbe Interaction*, 2013, 26(12): 1311–1317.
- [63] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1360–1375.
- [64] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, *et al.* Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 17(8): 2204–2216.
- [65] Turner M, Nizampatnam N R, Baron M, *et al.* Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 2042–2055.
- [66] Li H, Deng Y, Wu T, *et al.* Mis-expression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1759–1770.
- [67] De-Luis A, Markmann K, Cognat V, *et al.* Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2137–2154.
- [68] Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, *et al.* Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 160.
- [69] Wang Y, Li P, Cao X, *et al.* Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378(4): 799–803.
- [70] Dong Z, Shi L, Wang Y, *et al.* Identification and dynamic regulation of microRNAs involved in salt stress responses in functional soybean nodules by high-throughput sequencing [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2013, 14(2): 2717–2738.
- [71] 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 Journal*, 2009, 57(2): 313–321.
- [72] Kawashima C G, Matthewman C A, Huang S, *et al.* Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2011, 66(5): 863–876.
- [73] Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li Y F, *et al.* Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families [J]. *New Phytologist*, 2009, 184(1): 85–98.
- [74] Kulcheski F R, de Oliveira L F, Molina L G, *et al.* Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 307.
- [75] Turner M, Yu O, Subramanian S. Genome organization and characteristics of soybean microRNAs [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 169.
- [76] Waters B M, McInturf S A, Stein R J. Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(16): 5903–5918.
- [77] Abdel-Ghany S E, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic downregulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2008, 283(23): 15932–15945.
- [78] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, *et al.* SQUAMOSA promoter binding Protein-Like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 347–361.
- [79] Zeng Q Y, Yang C Y, Ma Q B, *et al.* Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 182.
- [80] Chen L, Wang T, Zhao M, *et al.* Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 375–386.
- [81] Zhou Z S, Huang S Q, Yang Z M. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(3): 538–542.
- [82] Wu H J, Wang Z M, Wang M, *et al.* Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(4): 1875–1884.