

DOI: 10.13376/j.cbls/2016083

文章编号: 1004-0374(2016)06-0645-10



李霞, 植物分子遗传学家, 现任华中农业大学植物科学技术学院教授。2004年, 她入选中科院“百人计划”, 组建了一支团结合作、富有创新力的科研团队, 在大豆共生固氮分子机制和植物耐逆境信号转导方面取得了一系列重要原创性成果。课题组长期以重要农作物大豆和模式植物拟南芥为材料, 从事调控大豆共生固氮及植物逆境响应的重要小分子 RNA 和功能基因的鉴定及其作用的分子机理的研究。实验室采用生理学、细胞学、分子生物学及生物化学等研究手段, 一方面对小分子 RNA 及其靶基因调控大豆根系结瘤及共生固氮的分子机制开展了系统的研究; 另一方面研究植物重要激素 ABA 介导的逆境响应分子机制。已在 *Nature Communications*、*Plant Cell*、*PLoS Genetics* 等国际主流学术刊物和专著中发表论文 40 余篇, 申请专利 10 余项。

microRNA172参与植物生长发育及逆境响应的研究进展

王幼宁¹, 苏超², 邹艳敏², 王利祥², 李霞^{1,3*}

(1 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 石家庄 050021; 3 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: microRNA (miRNA) 是一类长约 20~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 通过和靶基因 mRNA 上的一些特定序列结合, 诱导靶基因 mRNA 被剪切或抑制其翻译, 从而在转录后水平调控植物的生长发育和对逆境的响应。microR172 (miR172) 是植物中一个保守的 miRNA 家族, 通过靶向调控 *AP2* 和 *AP2-Like* 基因在植物发育和环境适应中发挥着不可或缺的作用。已有的研究表明, miR172 及其靶基因不仅在植物的时序转换中是一个关键调控因子, 也在花器官发育、土豆块茎形成、豆科结瘤和逆境响应等过程中发挥着重要调控作用。现将重点阐述这个明星 miRNA 在植物生长发育及对环境因子应答过程中的研究进展, 以为为深入解析 miR172 靶基因的作用机理和分子调控网络提供参考。

关键词: microRNA172; 植物时序转换; 器官发育; 胁迫响应

中图分类号: Q942.5; Q522 **文献标志码:** A

Research progress of microRNA172 in plant development and stress responses

WANG You-Ning¹, SU Chao², ZOU Yan-Min², WANG Li-Xiang², LI Xia^{1,3*}

(1 College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2 Center for Agricultural Research Resources, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China;

3 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: microRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs that are 20-25 nucleotides (nt) in length, and regulate plant development and stress responses at post-transcriptional levels. MicroRNA172 (miR172) is a highly conserved miRNA family in plants that are crucial for phase transition, organ development and stress responses

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31230050); 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX0800929B)

*通信作者: E-mail: xli@genetics.ac.cn

through repressing the *APETALA2(AP2)* or *AP2-like* genes encoding AP2/AP2-like transcription factors. Recently, miR172 has been identified as a key regulator of nodulation in legumes and tuber formation in potato. Here, we summarize the major findings on the miR172-mediated plant development and stress responses and discuss the recent progress that has improved our understanding of the growth regulation and plant response to abiotic stresses by miR172-mediated networks.

Key words: microRNA172; plant phase transition; organ development; stress response

植物中的 microRNA (miRNA) 是一类长度约为 20~25 nt 的单链非编码小分子 RNA^[1]。与蛋白质编码基因类似, miRNA 由 RNA 聚合酶 II (polymerase II) 转录, 形成称为初级转录物的 pri-miRNA, 其长度从几百到几千个碱基不等, 带有 5' 帽子和 3' polyA 尾巴, 以及 1 到数个发夹茎环结构^[2-3]。pri-miRNA 在 DCL1 (dicer like protein 1, DCL1) 蛋白的作用下, 被剪切成约含 70 nt, 且可自身折叠成茎环结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 被 DCL1 进一步剪切形成在 3' 端有两个碱基突出的成熟 miRNA-miRNA* 复合体^[3-4]。该 miRNA 复合体可在 HEN1 (HUAENHANCER1) 蛋白的作用下在其 3' 端的 2'-OH 位置被甲基化以维持其稳定而不被降解^[5]。被修饰后的 miRNA 复合体会在 HASTY (HST) 的辅助作用下被运输到细胞质中, 最后产生成熟 microRNA, 在 microRNA 诱导产生的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中发挥作用^[3,6]。2008 年, Brodersen 等^[7]发现, miRNA 除了通过剪切靶基因的转录产物使其沉默外, 还可以通过抑制蛋白质翻译的方式使靶基因沉默。

虽然成熟的 miRNA 很短, 但其碱基组成也存在很大的差异。到目前为止, 在植物中已经发现了上千种的 miRNA (<http://www.mirbase.org/>)。全基因组表达分析结果表明, 植物中的 miRNA 可能通过对其靶基因的调控介导着植物生长发育、营养高效和抗病耐逆等多个生物学过程。同时, 近期对 miRNA 的功能研究也充分证实了其在植物生长发育及逆境响应等多个生物学过程中所起的核心调控作用, 如 miR319 及 miR165/166 分别在调控拟南芥叶子的锯齿及极性方面发挥功能^[8-9]; miR156 和 miR172 在拟南芥花器官发育及时态转换过程中起着不可或缺的调节作用^[10-11]。此外, miRNA 在植物营养平衡方面也发挥着重要的功能, 如 miR399 参与调节拟南芥对磷的吸收过程^[12]等等。在诸多植物 miRNA 中, miR172 较早被发现, 它的作用方式和生物学功能也是研究得最深入的 miRNA 之一。本文主要对现有的有关 miR172 家族调控植物生长

发育及逆境响应的研究发现进行综述, 以期系统了解 miR172 在植物生长发育和环境适应各个过程中所发挥的重要作用, 同时, 也为深入解析由 miR172 所介导的植物生长发育及环境因子应答网络提供理论依据。

1 miR172的表达特点及其对靶基因的作用机制

1.1 miR172的结构和表达特点

miR172 是拟南芥中最早被克隆测序的 miRNA 之一^[13]。随后的研究表明, miR172 是非常保守的一类 miRNA, 在植物中广泛存在。最重要的是, 虽然 miR172 家族成员的长度和数目在不同的植物中各不相同, 但在进化上保守性极强, 近缘物种中序列几乎一致, 说明 miR172 的功能和作用方式在不同物种中可能也具有潜在的保守性。

虽然 miR172 家族含有多个成员, 但这些成员的作用并不是简单的重复。相关实验数据表明, miR172 家族成员的启动子结构和顺式调控元件组成并不相同, 因此, miR172 不同成员的表达具有时空特异性, 暗示着这些成员在植物发育的不同阶段或不同组织细胞中发挥着各不相同或者协同调控的作用^[14], 如拟南芥成熟的 miR172 为 21 nt。2004 年, Chen^[15]根据成熟碱基序列的差异将 miR172 分为 miR172a-1、miR172a-2、miR172b-1、miR172b-2 和 miR172c 5 个成员。虽然在拟南芥中, miR172 的整体表达水平是在种子萌发后, 随着幼苗的生长逐渐升高的, 并在进入生殖生长期后表达量达到最高^[16], 但是每一个家族成员的表达模式不尽相同。随着幼苗的生长, miR172a-1、miR172a-2 和 miR172b-1 表达逐渐升高, 到生殖生长时, 这些 miR172 成员的表达继续增加; 而 miR172b-2 和 miR172c 的表达却呈现不同的模式, 它们的表达量很低, 而且在植物生长过程中其表达量相对稳定, 没有显著变化^[17]。在水稻中, miR172 家族的 4 个成员 (miR172a~d) 均在水稻的幼苗期上调表达, 但是也呈现了不同的组织特异的表达模式, 如在谷粒中检测不到 miR172c 的表达。同样地, 在水稻中通过对 miR172 的表达

分析发现,其在营养生长的晚期和发育的幼穗表达,而其 AP2 家族的靶标基因 *SUPERNUMBERY BRACT (SNB)* 和 *Os03g60430* 在发育的穗中高表达^[18]。功能研究发现,过量表达 miR172 延缓了小穗分生组织向小花分生组织的转变,从而导致了小花和种子发育的缺陷。因 miR172 的表达水平和其靶标基因的表达水平并不呈负相关,所以,推测 miR172 在该过程的调控过程中很可能是通过抑制蛋白质翻译发挥功能的^[18]。2015年,进一步的研究结果发现,miR172 过表达并没有影响水稻的分蘖和株高,但是显著减少了水稻的穗分支,下调表达 miR172 则显著促进了水稻的穗分支。进一步的研究发现,miR172 通过 AP2 家族的靶基因 *OsTOE1* 和 *SNB (SUPERNUMERARY BRACT)* 参与了水稻的生殖生长^[19]。这说明 miR172 成员除了在水稻生长发育中共同发挥作用外,在特定组织器官发育中的作用却不尽相同^[16,20]。由此可见,miR172 家族成员在不同的植物中不仅参与了植物生长的经典时序转换过程,还参与其他生物过程。

在长期的进化中,随着植物物种的进化,miR172 家族成员也在数量和功能上发生了很大的变化。大豆是异源四倍体,其 miR172 家族成员高达 12 个,是植物 miR172 家族成员较多的一个。我们实验室前期研究发现,大豆 miR172 的众多成员也呈现出了时空和组织细胞表达特异性。有意思的是,除了一些在大豆的生长发育时期表达的 miR172 成员外,有些成员也在大豆特有的共生固氮过程中呈差异表达,并在结瘤过程中发挥重要作用^[21]。其中 miR172a、miR172b 和 miR172c 在根瘤菌侵染后快速上调,之后前两者表达量下调至初始量,并维持到侵染后 12 h,而 miR172c 则持续上升,并在成熟根瘤中达到最高水平^[21-23]。对 miR172c 的功能研究证实了该成员的确在结瘤中发挥着非常重要的作用。

植物的生长发育在持续变化的环境下呈现巨大的可塑性。作为一个重要的 miRNA 家族,miR172 也参与了植物对环境的响应和适应。miR172 的表达水平也受环境因素,如光周期、温度、渗透胁迫等的影响,并在植物对逆境响应和可塑性发育中起着不可忽略的作用^[17,24-25]。因此,明确 miR172 家族成员在植物生长发育过程中的组织细胞特异性表达模式以及对逆境的响应模式,这将有助于我们区分以及深入解析家族不同成员的调控功能。

1.2 miR172对靶基因的作用机制

miRNA 是通过调控其下游的靶基因来发挥作用^[3],miRNA 与靶基因 mRNA 之间的互补程度和相互作用的位置共同决定着 miRNA 对靶基因的调控方式^[26-28]。在植物中,miR172 的靶基因是 AP2/ERF 家族基因以及 AP2-like 基因。拟南芥 miR172 就是通过靶向 AP2 家族基因 *TARGET OF EAT (TOE1、TOE2 和 TOE3)*、*SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* 和 *SCHLAFMUTZE (SMZ)* 调控植物由营养生长到生殖生长的转变、花器官的形成以及开花时间等多个生物学过程^[29-31]。AP2/ERF 基因是植物中一个庞大的转录因子基因家族,因含有由 60~70 个氨基酸残基组成的 AP2/ERF 结构域而得名^[32]。根据序列相似性和 AP2/ERF 结构域的个数,AP2/ERF 转录因子家族被分为 AP2 (含 2 个 AP2/ERF 结构域)、ERF (含 1 个 AP2/ERF 结构域)、RAV (含 1 个 AP2/ERF 结构域和 1 个 B3 结构域)和 Soloist (含有 AP2-like 结构域)等 4 个亚家族^[32-34]。

miR172 与其靶基因的互补区域通常在靠近这些 AP2/ERF 家族基因 3'UTR 的 CDS 区,而且两者的序列互补近乎完全匹配;但是很多的研究结果发现,miR172 对靶基因的调控存在 mRNA 的剪切及翻译抑制两种方式^[15,17-18,29-30,35]。当 miR172 采取翻译抑制调控靶基因时,其与靶基因的表达模式不是呈相反的趋势,而常常表现出协同的表达模式,如在水稻中,miR172 与其靶基因 *OS03g60430* 和 *OS05g03040* 在胚胎和胚乳中的表达量均很低,尽管两者在两叶期、四叶期、十叶期和旗叶中的表达模式呈现相反的趋势,而在大多数组织中却表现的是协同表达的模式^[18]。水稻中的这个结果说明,miR172 在同一物种中的不同发育阶段、不同组织中也可能对靶基因存在两种方式。尽管目前大多研究结果显示 miR172 是在翻译水平调控靶基因,但是也陆续有实验证据表明,miR172 也可通过剪切靶基因的 mRNA 来负向调控其靶基因。在玉米中,miR172 通过降解 *GL15* 的 mRNA 调控玉米营养生长向生殖生长的时态转换^[36];在马铃薯中,miR172 可以降解靶基因 *RAP1* 的 mRNA 调控块茎的形成^[37];在大豆中,miR172c 通过剪切其靶基因 *GmNNC1 (soybean nodule number control 1)* 的 mRNA 来调控结瘤过程^[22]。这些研究结果证明,在植物中,miR172 对靶基因调控存在两种作用方式,具体方式有可能是具有发育时期或者组织细胞特异性。

2 miR172在植物生长发育及逆境响应过程中的功能

2.1 miR172调控植物自幼年生长向成年生长的时序转换

开花植物一生要经历幼年、成年和生殖生长3个重要生长阶段。每个生长阶段都有各自特征,因此,从幼年到成年及从成年到生殖生长的时序转换也有形态学上的标记可以区分,如叶形、叶片大小及表皮细胞形态可区分幼年和成年,生殖能力和花器官的发育则分别标志着成年和生殖生长阶段的起始^[38]。植物的时序转换的表征归结到底是由遗传来调控的,到目前为止 miR156 被认为是一个植物年龄的分子标记。在拟南芥中,随着植物的发育,miR156 表达逐渐下降,其靶基因 *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* 的表达逐渐上调,从而促进植物由幼年生长到成年生长的转换。有意思的是, *SPL* 家族基因编码的转录因子 SPL9/SPL10 可以直接结合在 miR172b 的启动子上激活其表达,从而促进植物由幼年期向成年期的转换^[11]。在此过程中,miR172 的靶基因 *TOE1* 和 *TOE2* 表达量也随着植物发育进程的推进逐渐降低^[17,29]。由此可见,miR172 在调控植物由幼年向成年转换过程中也发挥着非常重要的作用。同样地,miR172 也可视为植物年龄的分子标记。在玉米中,miR156 也通过调控 miR172 及其靶基因 *GLOSSY15 (GL15)* 控制玉米从幼年到成年的转换^[36,39]。由此可见,miR156-SPL/miR172-AP2 介导的从幼年到成年的转换机制可能在高等植物中广泛存在。随后的研究发现,miR156 表达下降所引起的生长时期的转换过程是由叶片产生的一个未知信号所引发的^[40]。

2.2 miR172参与调控植物的开花时间

miR172 同时也调控植物由营养生长向生殖生长的转换过程。开花是象征植物由营养生长向生殖生长转化的重要事件。植物在适宜的条件下,完成开花结实以繁衍后代,因此,为了应答和适应复杂多变的生长环境,植物在长期的进化过程中形成了复杂且精细的分子调控机制,整合内源发育和环境信号对开花时间进行严格的控制^[41]。

近些年来,已有为数不多的几个 miRNA 家族已经被证实通过抑制或者促进营养生长到生殖生长的转换来调控植物的开花时间。这些家族,包括 miR159、miR319、miR390、miR399、miR156 和 miR172 家族^[3,42-46]。其中,miR172 是调控植物开花的一类重要因子。过表达 miR172 无论在长日照

还是短日照条件下都造成转基因植物极端早花表型^[14,29]。植物早花主要是由于 miR172 过表达造成了开花关键调控基因 *FT (FLOWER LOCUS T)* 的高表达所致^[14]。miR172 对开花时间的调控也是通过对其 AP2/ERF 家族靶基因的翻译抑制实现的,因为早花的 miR172 过表达,植物中 *TOE1*、*TOE2* 和 *AP2* 的转录水平并没有变化。通过免疫杂交分析发现,AP2 的蛋白水平显著降低^[29],而且 miR172 的靶基因功能缺失突变体的单个突变、双突变以及 *toe1 toe2 smz snz* 四重突变体虽然也表现延迟的开花表型,但是都比 miR172 过表达得晚^[29]。只有所有 *AP2* 靶基因均发生突变即六重突变才表现类似的极端早花表型,说明 miR172 的这些靶基因在调控植物开花时间的时候功能是高度冗余的^[11,46-47]。相反地,过表达 miR172 的靶基因,如 *SMZ* 或者 *SNZ* 都造成植物晚花表型^[30,35,46]。*SMZ* 和 *TOE1* 负向调控 *FT* 的表达^[14,35,47],从而确定了这些靶基因介导了 miR172 对植物开花时间的调控过程。miR172 及其靶基因调控拟南芥开花的机制研究得较多,同时,在水稻^[16,48]、牵牛^[49]、百脉根^[50]、大豆^[51] 等多个物种中的研究均已证明了 miR172 及其靶基因在开花时间调控上的重要作用。这些结果表明,miR172 介导的开花机制在植物中也是保守的。

miR172 介导的开花时间也不是简单的由线性信号通路调控的,一个由 AP2 介导的负向反馈通路控制 miR172 的转录水平,对植物的开花时间进行动态而精细的调控^[29,47,45,52]。已有的结果表明,miR172 似乎是一个分子交汇点,整合了多个开花调控信号途径实现对植物开花的调控。miR172 不仅受年龄依赖的信号通路 miR156 及靶基因的调控,还通过 GI 和 FCA 分别受到光周期和温度介导的开花途径的调控^[12,17,20,24,29,42,52]。因此,miR172 参与开花调控的机制比我们想象的更加复杂。

光周期途径是调控植物开花的复杂调控网络中的一个关键的组成部分^[42,53]。miR172 的表达水平不仅与发育进程相关,还受到光周期的影响。*FT* 是光周期信号通路中转录因子 CO 下游的重要靶基因,其只有在日照长度达到阈值时才表达,这种诱导表达也是长日植物开花的必要条件^[54]。Jung 等^[17] 研究发现,miR172 在短日照下表达水平低于长日照下,通过调控 *FT* 基因介导光周期开花途径;在拟南芥 CO 突变体 *co-2* 中过表达 miR172a 可以显著提前开花时间^[17],推测过表达 miR172 可以影响 CO-like (COLs) 蛋白的功能。2015 年,Zhang

等^[55]研究显示,有一些COLs蛋白(COL1和COL5)可以通过与TOE1及其相关蛋白相互作用,抑制*FT*基因的表达。这一系列结果表明,TOE蛋白可能是一个整合发育和环境信号通路的重要因子,尤其是光周期开花途径,从而调控植物在合适的年龄和时间开花。

适当的低温可以促进植物成花,而miR172同样也被发现参与调控植物对温度变化的响应及其介导的开花过程。通过高通量测序技术对低温条件下蝴蝶兰不同组织中特异microRNAs表达变化的研究,同样表明,在由营养生长到生殖生长的转变过程中,miR156与miR172发挥重要作用^[56]。Lee等^[24]研究发现,miR172在23℃时相对于16℃表达水平上调,过表达miR172a导致拟南芥对温度的敏感性降低。而在小麦中的表达检测结果发现,低温处理却会促进小麦中miR172的表达^[57]。Jung等^[58]研究发现,拟南芥的RNA结合蛋白FCA能够对温度产生应答,促进Pre-miRNA172的加工过程,从而大量积累,进而形成FCA-miRNA172在变动环境温度下微调开花的策略。2013年,Zhou等^[59]确定两个年龄相关的miR156和miR172调控了碎米荠响应春化作用的时间,还证实年龄和春化信号通路通过调控促开花*MADS-box*基因*CfSOCI*的表达,从而协同调控植物的开花过程。

2015年,Zhai等^[60]发现,免疫激素茉莉酸可以通过调控*FT*的表达延迟植物的开花。更有意思的是,其发现TOE1和TOE2可以与部分JAZ蛋白相互作用并形成“转录因子-转录抑制子”复合物,这个复合物被证明可以直接结合*FT*的染色质而调控其表达^[60]。在正常条件下,JAZ蛋白可以拮抗TOE对*FT*转录的抑制,从而使得*FT*的表达稳定在一定的水平,保证了植物的正常开花。相反,当昆虫或病原菌侵害植物时,使得植物体内的活性茉莉酸含量迅速升高,从而诱导JAZ被泛素化并通过蛋白酶体降解,这同时也导致了TOE蛋白的去抑制化,促进了TOE对*FT*的抑制,使得*FT*的表达水平降低,导致开花延迟^[60]。这一结果进一步丰富了miR172及其靶基因在植物开花时间调控机制中的作用,证明了其不仅可以参与调节植物在正常条件下的开花时间,还可以参与植物在应答外界昆虫或病原菌侵害时主动调节开花时间以保证顺利开花结实和繁衍后代的调控过程。

2.3 miR172在花器官发育中的作用

除了众所周知的miR172在调控生长过程转换

中的重要作用外,它也参与了各种植物器官的发育。早在2004年,Chen等^[15]就发现miR172在拟南芥中也影响花器官的发生发育。过表达miR172造成拟南芥花器官发生发育的异常,随后的研究证实miR172主要是可以通过在翻译水平负调控*AP2*基因决定花器官的发育^[29]。*AP2*是ABC模型中的A功能基因,主要在花发育早期和至少3个基因*APETALA1*(*AP1*)、*LEAFY*(*LFY*)和*CAULIFLOWER*(*CAL*)共同作用,促进植物花分生组织的形成^[61-62];调控花器官,如萼片、花瓣等的发育^[15,63]。相关研究结果显示,*AP2*在所有4轮器官中都表达,*AP2*基因在花器官的发育过程中调控着其他基因^[64-65]。作为*AP2*的上游调控基因,不难想象miR172通过负向调控*AP2*也参与花器官分生组织的形成、花器官的组织身份确定^[15]。*AP2* mRNA主要积累在花器官的外周,miR172和*AP2*表达模式在这些部位是重叠的^[66]。即使miR172和*AP2*的表达重叠是非常短暂的,但两者调控花分生细胞的时序进程,在花器官发育中起着决定性的作用^[67]。

除了在拟南芥花器官中的作用外,miR172及其靶基因似乎在其他植物花器官的发生发育中也有类似的功能。如在烟草中过表达拟南芥的miR172或者*AP2*造成烟草花结构的异常^[68],说明了miR172/*AP2*调控花器官发育的重要保守作用。的确如此,不管双子叶还是单子叶植物,不管花的形态如何,miR172/*AP2*都在花的发育中不可或缺。在水稻中,过表达miR172b延迟水稻花发育过程中由小穗分生组织向花分生组织的过渡,导致花和种子发育的缺陷及育性和产量的降低^[18]。在大麦中,miR172和其*AP2*同源基因*Cleistogamy1*(*Cly1*)与浆片的发育直接相关。如在*Cly1*上miR172的作用位点发生了单碱基同义代换,将造成大麦浆片发育异常,导致闭颖受精。因此,推测miR172通过下调*Cly1*的表达而促进大麦浆片的发育,从而导致大麦出现开颖受精^[69]。即使在园艺植物墨兰中,也发现miR172可能通过其靶基因Ce*AP2-like*转录因子调控墨兰花的结构^[70]。猕猴桃如果缺失miR172的话,也造成无限花序发育异常^[71]。因此,miR172/*AP2*分子模块对保证植物花器官的正常发育和繁衍是至关重要的。深入研究该模块介导的花发育的分子机制和调控网络不仅可使我们深入了解花发育背后的重要科学问题,也将对遗传改良作物的产量和重要经济性状有重要借鉴作用。

2.4 miR172参与调控马铃薯块茎的形成

在已有的报道中, 针对 miR172 在植物生长发育过程中的作用多集中在对植物地上部分的研究, 而针对其在植物地下器官生长发育中的功能的报道很少。有意思的是, Martin 等^[37]发现, 在可以诱导马铃薯块茎形成的短日照条件下, miR172 在茎中和膨大的匍匐茎中表达量比长日照下显著提高, 预示着 miR172 可能在马铃薯块茎形成过程中发挥作用。过表达 miR172 能够显著促进马铃薯块茎的形成, 而且转基因马铃薯的块茎在短日照下形成的时间要比在长日照下形成的早, 说明 miR172 正向调控马铃薯块茎的形成, 而这种 miR172 介导的对马铃薯块茎形成的促进作用是依赖于光周期的, 而过表达 miR172 降低了马铃薯在块茎形成过程中对光周期的敏感性^[37]。

值得一提的是, Martin 等^[37]发现 miR172 主要在马铃薯茎的维管束中大量表达, 并进一步通过嫁接实验证明, 在马铃薯中, miR172 是可以长距离运输的。这一 miR172 可以长距离运输的现象在烟草中同样得到证实^[72]。此外, 他们也证明了 miR172 主要是通过负向调控其靶基因 *RAP1 (RELATED TO APETALA2 1)* 实现对马铃薯块茎发育过程的调控^[37]。由于在马铃薯中过表达 miR172 没有影响到花器官的发育, 只是影响到开花时间和块茎的形成, 推测 miR172 在马铃薯中的功能可能与其在其他植物中的功能有所不同^[37]。2014年, Lakhotia 等^[73]高通量测序结果也证实, 在马铃薯块茎形成过程中 miR172 的表达变化最为明显, 进一步支持 miR172 在马铃薯块茎形成中的重要作用; 但是, 该研究结果显示不同的 miR172 家族成员在马铃薯块茎形成的各个时期的表达有差异, 如 miR172-5 在马铃薯块茎形成的极早期即在弯曲的匍匐茎尖 (PT1) 和膨大的匍匐茎 (PT2) 中一直有适量的表达, 当到达块茎发生时期 (PT3) 时, 表达量出现轻微下降。与之不同, miR172-1 在块茎形成过程中一直保持了较高水平的表达, 在块茎形成的 PT1 和 PT2 阶段表达水平有显著升高, 并在 PT2 阶段表达水平达到最高^[73]。这些结果说明不同的 miR172 家族成员在马铃薯块茎形成过程中可能具有发育时期的特异性, 连续的或者协同地调控着马铃薯块茎形成的各个过程。

2.5 miR172在豆科植物结瘤中的功能

根系结瘤及其共生固氮过程是豆科植物所特有的性状, 主要分为植物细胞和根瘤菌识别和侵染、根瘤的发生和发育及成熟根瘤的固氮。在过去的几

十年中, 已经发现了 Nod Factor Receptors 以及一些结瘤相关的调控基因如 *NIN (Nodule Inception)*、*CCaMK (Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase)* 和 *NSP1/2 (Nodulation Signaling Pathway 1/2)* 等^[74-75]。由于结瘤和固氮过程涉及植物-根瘤菌两种生物的相互作用, 所以调控这一生物学过程的机制更为复杂。到目前为止, 我们对调控豆科植物结瘤的详尽分子机制的了解只是冰山一角。miRNA 在豆科植物结瘤中的作用很早就受到了关注, 并先后在豆科植物蒺藜苜蓿、百脉根和大豆等植物中得到了验证^[22, 76-80]。其中, 苜蓿中的 miR166 与 miR169 首先被证实参与了根瘤发育的调控^[76-77]; 随后, miR171、miR397 和 miR156 也被证明在百脉根根瘤发育过程中发挥着重要作用^[78-79]; 在大豆中, 异位过表达 miR482、miR1512、miR1515、miR156 及 miR167 也显著改变大豆根瘤数量^[80-81]。这些结果充分证明了 miRNA 在豆科植物结瘤和共生固氮过程中发挥着至关重要的作用。

对 miR172 在大豆根系结瘤中的作用的关注源于对根瘤菌侵染 3 h 大豆根的全基因组 miRNA 的测序和成熟根瘤的 miRNA 分离和鉴定。有意思的是, miR172 受根瘤菌侵染的高度诱导^[23], 本实验室在 2009 年也通过克隆测序的方法在成熟根瘤中检测到 miR172c 有较高水平的表达^[21]。这些结果暗示, miR172 在大豆结瘤的早期侵染和后期的固氮过程中都发挥着重要的调控作用。2013年, Yan 等^[82]发现过表达 miR172 或预测的靶基因可以相应地增加或减少结瘤的数目和固氮酶的活性, 从而证明了 miR172 在大豆根系结瘤及共生固氮过程中的重要生物学功能。随后本实验室通过对 miR172 家族成员系统分析发现, miR172 家族成员在根瘤发育中呈差异性表达, 其中 miR172c 受根瘤菌以及结瘤因子的诱导最为显著, 而且随着根瘤发育表达持续增高, 在成熟根瘤升至最高。遗传学实验证明了 miR172c 正向调控大豆结瘤的早期侵染、根瘤原基发生发育和最终的结瘤数目。此外, Wang 等^[22]发现, miR172c 主要是通过剪切其关键的靶基因 *GmN1C1* 发挥作用。*GmN1C1* 编码一个 AP2 家族的转录抑制子, 直接结合在一个重要的早期结瘤因子基因 *ENOD40* 的启动子上, 调控其转录活性, 实现对结瘤数目的调控。有意思的是, 实验结果证明, miR172c 不仅是结瘤因子 (NF) 信号通路中的关键调控组分, 其表达还受到一个结瘤自调控 (autoregulation of nodulation, AON) 信号通路的抑

制^[22]。这些结果暗示, miR172c有可能是整合NF和AON信号通路的关键节点。2015年,在菜豆以及百脉根中的研究结果进一步表明,miR172c是调控豆科植物结瘤多个过程的关键基因^[83-84]。所以,miR172及其靶基因调控的豆科植物结瘤和共生固氮过程很可能是一个保守的机制。进一步研究miR172及其靶基因介导的结瘤过程的分子机制和调控网络将有助于全面了解豆科植物结瘤和固氮过程调控的遗传机理。

2.6 miR172参与调控植物对逆境的响应

植物一直生长在不断变化的环境中。由于它们不能像动物一样在遇到逆境时用逃避的办法躲避伤害,因此,植物也演化出了植物特有的、复杂且精细的分子调控机制来应对各种环境胁迫。大量的基于全基因组的分析结果表明,miRNA在植物应对多种非生物和生物胁迫的过程中发挥着非常重要的作用。作为一个非常保守的miRNA家族,miR172的表达也受多种胁迫,如低温、盐碱和干旱等的诱导,参与了植物(小麦、大豆、番茄、马铃薯等)对各种环境胁迫的响应^[85-88]。当然,不同植物中miR172家族成员在介导植物对不同逆境响应的过程中也不尽相同^[57,89-91],如在胡萝卜中,miR172a对盐胁迫的响应最为显著^[89];在大豆中,miR172c参与植物对渗透胁迫的响应;在拟南芥中,过表达大豆miR172c能够显著增强拟南芥对水分缺失以及盐胁迫的应答^[92]。在拟南芥中,miR172b主要通过调控其靶基因SNZ,以ABA信号通路依赖的方式介导着植物对渗透胁迫的响应^[93];miR172e则是唯一受干旱诱导的miR172家族成员,过表达miR172e的植物抗旱性显著增强;另外,干旱对miR172e的诱导是依赖于GI(GIGANTEA),并有可能通过抑制下游基因WRKY44的表达以及靶基因TOE1与WRKY44的互作调控拟南芥对干旱的响应^[94]。

这些研究结果说明,miR172在植物响应环境胁迫的过程中的作用相对是比较保守的,但整体来看,目前对miRNA参与植物逆境的研究基本停留在全基因组表达谱的分析层面。对miR172介导植物对逆境响应机制的研究还非常初步,miR172在逆境条件的调控机制及其在不同植物中调控植物对不同逆境的响应的分子机制基本上还不清楚。

3 展望

近年来,随着第二代测序技术应用,有关植物miRNA表达谱分析快速增加,而miR172家族成员

也出现在几乎所有已检测的生物过程中,也使我们对于miR172的重要性的认识不断提高。虽然我们对miR172和靶基因在时序转换、器官发育和逆境响应过程中调控作用有了一定的认识,但是到目前为止,这些研究还仅限于笼统地界定miR172和靶基因在某个生物学过程中的作用,对miR172如何在发育以及组织细胞水平特异地调控某个生物学过程及该过程的分子调控网络是怎样的仍然还是一个谜,有很多的科学问题亟需我们来回答。比如,miR172在植物共有的过程,如开花和耐逆等中的功能,仍需继续鉴定miR172上游的调控因子以及miR172/靶基因下游因子,从而阐明miR172如何整合发育及逆境信号从而调控这些生物过程的分子机制;结合表达分析数据,还需要进一步明确,miR172家族成员在调控这些过程中的作用模式。miR172在豆科植物结瘤和马铃薯块茎形成中的作用说明,其在植物种类特有的生物过程中也发挥着非常重要的调控作用。除了需要继续解析miR172及其靶基因参与豆科结瘤和马铃薯块茎形成的分子网络外,还需要探究miR172都参加了哪些植物特有的重要生物学过程或性状的形成,介导这些过程的分子机制是怎样的。此外,通过生物信息学的分析结果可以发现,不同物种间的miR172家族成员的核心序列虽然非常保守,但是核心序列外的核酸结构可能决定靶基因的特异性以及和靶基因的作用方式。决定这些miR172结构差异的机制和靶基因特异性的分子机制目前尚不清楚。另外,在不同物种中miR172家族成员数目差异很大。基因组结构和miR172家族成员及其结构和功能间的关系也是一个需要回答的问题。

目前,各种现代先进的生物学技术发展日新月异,我们可以借助组织细胞特异或者单细胞的各种组学和其他研究手段,构建miR172-靶基因介导重要生物学过程的模型或者分子调控网络,并结合功能基因组学研究结果,系统深入地解析miR172及其靶基因参与的植物发育和逆境响应调控机理。这些研究结果将不仅可使我们借助miR172的功能研究更加深入地理解很多重要的基础生物学问题,也将为我们未来分子设计改良作物的重要或者特殊的农艺或者经济性状提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 2013, 25: 2383-99

- [2] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23: 4051-60
- [3] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53
- [4] Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12753-8
- [5] Li J, Yang Z, Yu B, et al. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15: 1501-7
- [6] Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3691-6
- [7] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 2008, 320: 1185-90
- [8] Kidner CA, Martienssen RA. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 2004, 428: 81-4
- [9] Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, et al. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol*, 2008, 6: e230
- [10] Wang JW, Schwab R, Czech B, et al. Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2008, 20: 1231-43
- [11] Wu G, Park MY, Conway SR, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138: 750-9
- [12] Branscheid A, Sieh D, Pant BD, et al. Expression pattern suggests a role of miR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during *arbuscular mycorrhizal* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23: 915-26
- [13] Park W, Li J, Song R, et al. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12: 1484-95
- [14] Zhu QH, Helliwell CA. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot*, 2011, 62: 487-95
- [15] Chen XM. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303: 2022-5
- [16] Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, et al. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 25
- [17] Jung JH, Seo YH, Seo PJ, et al. The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19: 2736-48
- [18] Zhu QH, Upadhyaya NM, Gubler F, et al. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 149
- [19] Wang L, Sun S, Jin J, et al. Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 15504-9
- [20] Zhu QH, Spriggs A, Matthew L, et al. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Res*, 2008, 18: 1456-65
- [21] Wang Y, Li P, Cao X, et al. Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 799-803
- [22] Wang Y, Wang L, Zou Y, et al. Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate *ENOD40* expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, 2014, 26: 4728-801
- [23] Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics*, 2008, 10: 160
- [24] Lee H, Yoo SJ, Lee JH, et al. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 3081-93
- [25] German MA, Pillay M, Jeong DH, et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 941-6
- [26] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, 297: 2056-60
- [27] Llave C, Xie Z, Kasschau KD, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297: 2053-6
- [28] Schwab R, Palatnik JF, Riester M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*, 2005, 8: 517-27
- [29] Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. *Plant Cell*, 2003, 15: 2730-41
- [30] Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, et al. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, 2003, 130: 6001-12
- [31] Jung JH, Leea S, Yuna J, et al. The miR172 target TOE3 represses AGAMOUS expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Sci*, 2014, 215-216: 29-38
- [32] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 411-32
- [33] Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819: 86-96
- [34] Shu Y, Liu Y, Zhang J, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci*, 2016, 6: 1247
- [35] Mathieu J, Yant LJ, Murdter F, et al. Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol*, 2009, 7: e1000148
- [36] Lauter N, Kampani A, Carlson S, et al. microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:

- 9412-7
- [37] Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, et al. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development*, 2009, 136: 2873-81
- [38] Poethig RS. Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19: 374-8
- [39] Chuck G, Meeley R, Irish E, et al. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nat Genet*, 2007, 39: 1517-21
- [40] Yang DH, Hettenhausen C, Baldwin IT, et al. The multifaceted function of BAK1/SERK3: plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 1322-4
- [41] Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, et al. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 345-70
- [42] Kim SY, Yu X, Michaels SD. Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* expression in response to changing light quality. *Plant Physiol*, 2008, 148: 269-79
- [43] Rubio-Somoza I, Weigel D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 258-64
- [44] Jin D, Wang Y, Zhao Y, et al. MicroRNAs and their crosstalks in plant development. *J Genet Genomics*, 2013, 40:161-70
- [45] Huijser P, Schmid P. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 2011, 138: 4117-29
- [46] Yamaguchi A, Abe M. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *J Plant Res*, 2012, 125: 693-704
- [47] Yant L, Mathieu J, Dinh TT, et al. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*, 2010, 22: 2156-70
- [48] Lee YS, Lee DY, Cho LH, et al. Rice *miR172* induces flowering by suppressing *OsIDS1* and *SNB*, two AP2 genes that negatively regulate expression of *Ehd1* and florigens. *Rice*, 2014, 7: 31
- [49] Glazińska P, Zienkiewicz A, Wojciechowski W, et al. The putative miR172 target gene *lnAPETALA2*-like is involved in the photoperiodic flower induction of *Ipomoea nil*. *J Plant Physiol*, 2009, 166: 1801-13
- [50] Yamashino T, Yamawaki S, Hagui E, et al. Clock-controlled and FLOWERING LOCUS T (FT)-dependent photoperiodic pathway in *Lotus japonicus* II: characterization of a microRNA implicated in the control of flowering time. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77: 1179-85
- [51] Zhao X, Cao D, Huang Z, et al. Dual functions of GmTOE4a in the regulation of photoperiod-mediated flowering and plant morphology in soybean. *Plant Mol Biol*, 2015, 88: 343-55
- [52] Zhou CM, Wang JW. Regulation of flowering time by microRNAs. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 211-5
- [53] Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, et al. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science*, 2007, 318: 261-5
- [54] Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, et al. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 410: 1116-20
- [55] Zhang B, Wang L, Zeng L, et al. *Arabidopsis* TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. *Genes Dev*, 2015, 29: 975-87
- [56] An FM, Hsiao SR, Chan MT. Sequencing-based approaches reveal low ambient temperature-responsive and tissue-specific microRNAs in *Phalaenopsis orchid*. *PLoS One*, 2011, 6: e18937
- [57] Gupta O, Meena N, Sharma I, et al. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 4623-9
- [58] Jung JH, Seo PJ, Ahn JH, et al. *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *J Biol Chem*, 2012, 287: 16007-16
- [59] Zhou CM, Zhang TQ, Wang X, et al. Molecular basis of age-dependent vernalization in *Cardamine flexuosa*. *Science*, 2013, 340: 1097-100
- [60] Zhai QZ, Zhang X, Wu F, et al. Transcriptional mechanism of jasmonate receptor COI1-mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 2814-28
- [61] Shannon S, Meeks-Wagner DR. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1993, 5: 639-55
- [62] Ma H. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes Dev*, 1994, 8:745-56
- [63] Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, et al. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, 1996, 8: 155-68
- [64] Litt A. An evaluation of A-function: Evidence from the *APETALA1* and *APETALA2* gene lineages. *Int J Plant Sci*, 2007, 168: 73-91
- [65] O'Maoileidigh DS, Graciet E, Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol*, 2014, 201: 16-30
- [66] Wollmann H, Mica E, Todesco M, et al. On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development*, 2010, 137: 3633-42
- [67] Ji L, Liu X, Yan J, et al. *ARGONAUTE10* and *ARGONAUTE1* regulated the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1001358
- [68] Mlotshwa S, Yang Z, Kim YJ, et al. Floral patterning defects induced by *Arabidopsis* APETALA2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol*, 2006, 61:781-93
- [69] Nair K, Wang N, Turuspekov Y, et al. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 490-5
- [70] Yang FX, Zhu GF, Wang Z, et al. A putative miR172-

- targeted *CeAPETALA2*-like gene is involved in floral patterning regulation of the orchid *Cymbidium ensifolium*. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 12049-61
- [71] Varkonyi-Gasic E, Lough RH, Moss SMA, et al. Kiwifruit floral gene *APETALA2* is alternatively spliced and accumulates in aberrant indeterminate flowers in the absence of miR172. *Plant Mol Biol*, 2012, 78: 417-29
- [72] Kasai A, Kanehira A, Harada T. miR172 can move long distances in *Nicotiana benthamiana*. *Open Plant Sci J*, 2010, 4: 1-6
- [73] Lakhota N, Joshi G, Bhardwaj AR, et al. Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 6
- [74] Hirsch S, Kim J, Munoz A, et al. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2009, 21: 545-57
- [75] Trichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, et al. Deregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, 2006, 441: 1153-6
- [76] Combiér JP, Frugier F, De Billy F, et al. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev*, 2006, 20: 3084-8
- [77] Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, et al. MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J*, 2008, 54: 876-87
- [78] De Luis A, Markmann K, Cognat V, et al. Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, 2012, 160: 2137-54
- [79] Wang Y, Wang Z, Amyot L, et al. Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290: 471-84
- [80] Wang YN, Li KX, Chen L, et al. MicroRNA167-directed regulation of the auxin response factors, GmARF8a and GmARF8b, is required for soybean (*Glycine max* L.) nodulation and lateral root development. *Plant Physiol*, 2015, 168: 101-16
- [81] Li H, Deng Y, Wu T, et al. Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1759-70
- [82] Yan Z, Hossain MS, Wang J, et al. MiR172 regulates soybean nodulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, 26: 1371-7
- [83] Nova-Franco B, Íñiguez LP, Valdés-López O, et al. The micro-RNA172c-APETALA2-1 node as a key regulator of the commonbean-*Rhizobium* etlinitrogenfixation symbiosis. *Plant Physiol*, 2015, 168: 273-91
- [84] Holt DB, Gupta V, Meyer D, et al. microRNA172 (miR172) signals epidermal infection and is expressed in cells primed for bacterial invasion in *Lotus japonicus* roots and nodules. *New Phytol*, 2015, 208: 241-56
- [85] Zhou X, Wang G, Sutoh K, et al. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779: 780-8
- [86] Frazier TP, Sun G, Burkley CE, et al. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Mol Biotechnol*, 2011, 49: 159-65
- [87] Yang J, Zhang N, Ma C, et al. Prediction and verification of microRNAs related to proline accumulation under drought stress in potato. *Comput Biol Chem*, 2013, 46: 48-54
- [88] Candar-Cakir B, Arican E, Zhang B. Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrnas and their important roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant Biotechnol J*, 2016, [Epub ahead of print]
- [89] Sun X, Xu L, Wang Y, et al. Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics*, 2015, 16: 197
- [90] Hwang EW, Shin SJ, Park SC, et al. Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*. *Genes Genom*, 2011, 33: 105-10
- [91] Zhou L, Liu Y, Liu Z, et al. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot*, 2010, 61: 4157-68
- [92] Li W, Wang T, Zhang Y, et al. Overexpression of soybean miR172 confers water deficit and salt tolerance but ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2016, 67: 175-94
- [93] Zou Y, Wang Y, Wang L, et al. miR172b controls the transition to autotrophic development inhibited by ABA in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2013, 8: e64770
- [94] Han Y, Zhang X, Wang W, et al. The suppression of *WRKY44* by GIGANTEA-miR172 pathway is involved in drought response of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2013, 8: e73541