

植物 miRNA 及其在植物发育进程和环境胁迫响应中的潜在功能

刘运华^{1,2,*}, 刘灶长^{1,*}, 罗利军^{1,**}¹上海市农业生物基因中心, 上海 201106; ²华中农业大学植物科学学院作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

Plant miRNA and Its Potential Role in Plant Developmental Process and Environmental Stress Responses

LIU Yun-Hua^{1,2,*}, LIU Zao-Chang^{1,*}, LUO Li-Jun^{1,**}¹Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106, China; ²National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, College of Plant Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

提要: 文章介绍植物 miRNA 的产生、作用和 miRNA 的靶基因发掘以及 miRNA 在植物发育进程和环境胁迫响应中的潜在功能研究进展。

关键词: 植物 miRNA; 发育进程; 胁迫响应; 潜在功能

microRNA (miRNA) 是一类具有 22 个左右核苷酸(nt)并具有调控作用的非编码单链 RNA 分子, 广泛存在于植物、线虫、人类等真核生物的细胞中(Bartel 2004)。1993 年, Lee 等(1993)用经典的定位克隆方法首先在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中克隆到 *lin-4* 基因, *lin-4* 可以产生一种小 RNA 分子, 后者能以不完全互补的方法与其靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)相互作用来抑制 *lin-14* 的表达, 并导致 *lin-14* 的蛋白质合成减少。但当时 *lin-4* 的发现没有引起人们的广泛重视。直到 2000 年在线虫及人类(*Homo sapiens*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现 *let-7* 的同源物后(Reinhart 等 2000), 人们才意识到 miRNA 可能是一类在进化过程中保守的, 并在生命过程中起调控作用的分子。嗣后, 随着越来越多的 miRNA 的发现, 它在动物、植物、细菌以及病毒的细胞生长发育过程中的调控作用开始受到关注。它们能导致靶基因 mRNA 的降解(transcriptional gene silencing, TGS), 从而有效抑制相关蛋白质的合成, 或者抑制靶基因 mRNA 的表达, 但不影响 mRNA 本身的丰度, 产生转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。迄今为止认为可能超过 1/3 的人类基因都受 miRNA 的调控。

miRNA 在动植物中的作用方式主要区别在于: 植物的 miRNA 与靶基因 mRNA 高度互补,

并与之结合而降解靶基因 mRNA; 动物的 miRNA 多数通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 不完全匹配而抑制靶基因 mRNA 的表达(Jones-Rhoades 和 Bartel 2004; Rhoades 等 2002)。miRNA 的发现补充了 RNA 水平上对基因的调控机制, 展现了细胞内基因表达的全方位调控、多成次的网络系统, 同时也是对中心法则的补充。本文介绍了 miRNA 在植物发育进程和环境胁迫响应中的研究进展。

1 植物中的 miRNA 及其作用

迄今为止, 在果蝇、线虫、动物、植物和病毒等各种生物中已经发现了超过 4 000 个 miRNA 基因(数据见 Sanger Browse miRBase Database)。其中在植物中发现的 miRNA 有近千个。已经得到鉴定的 miRNA 大都是由约 70 nt 形成发夹结构的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工生成, 它是具有 5' 端磷酸基和 3' 羟基, 大小 21~25 nt 的小分子 RNA 片段, 并定位于 RNA 前体的 3' 端或者 5' 端。miRNA 基因先在细胞核内转录成原始 miRNA (pri-miRNA), 再加工成前体 miRNA (pre-miRNA), 然

收稿 2007-06-22 修定 2007-08-20

资助 上海市浦江人才计划(05PJ14085)和上海市科委重大基础研究项目(03DJ14015)。

* 第一、第二作者贡献相同。

** 通讯作者(E-mail: lijun@sagc.org.cn; Tel: 021-62200490)。

后转运到细胞质中加工成成熟的 miRNA。动物的 miRNA 常常来自于编码蛋白质的基因前体中的内含子区域(Baskerville 和 Bartel 2005), 与之不同的是, 植物的 miRNA 存在于与编码蛋白无关的基因间区域(Baulcombe 2004)。Northern、表达序列标签(expressed sequence tag, EST)和基因定位表明, 植物的原始 miRNA (pri-miRNA)和动物的一样都包括有 miRNA 茎环结构(stem-loop) (Aukerman 和 Sakai 2003), 并有部分接合、多聚和加帽。和动物 miRNA 一样, RNA 聚合酶 II 在大部分植物 miRNA 的转录中起作用(Xie 等 2005), 但有关更多的植物 miRNA 的具体转录机制还不太清楚。

一些 RNase III 核酸内切酶在植物中 pri-miRNA 生成成熟的 miRNA 步骤中起关键作用。和动物中的 Drosha 一样, 植物中的 DCL1 在第一步剪切中起作用(Kurihara 和 Watanabe 2004)。DCL1 在植物中同时具有 Dicer 和 Drosha 的功能, 在核内 miRNA/miRNA* 双链释放的两步中起切割作用(Park 等 2005)。虽然植物 miRNA 常常在 5' 或 3' 末端长短不一, 但 DCL1 总是在 miRNA 的茎环结构前体中特异位置进行切割产生累积的成熟 miRNA (Reinhart 等 2002)。但 DCL1 究竟如何识别切割位点至今仍是谜。和 miRNA 的一级结构相比, miRNA 前体的二级结构对其功能来说似乎更加重要, 在 miRNA 前体的茎环结构中, 在保持配对类型和配对残余不变的情况下对与成熟 miRNA 区域配对的部分进行替代, 并不影响 miRNA 行使功能(Vaucheret 等 2004), 但产生的 miRNA 长度会发生改变, miRNA 的基本序列和不配对残余的空间结构在决定切割位点上有一定的作用。遗传学、分子生物学和生物化学的证据表明, *HYPOPLASTIC LEAVES1 (HYL1)* 在 miRNA 的生物合成中是 DCL1 的重要辅助物(Hiraguri 等 2005)。*HYL1* 基因产物参与 DCL1 在位点识别和其他功能的行使。另一个 *HUA ENHANCER1 (HEN1)* 包含有甲基转移酶功能域, 可甲基化 miRNA/miRNA* 复合物(Yu 等 2005)。miRNA/miRNA* 复合物受 DCL1 介导的切割和 *HEN1* 介导的甲基化后, 被装载进 *AGO1*, 一部分 miRNA 分子转移出核并经 *HASTY (HST)* 转运进入细胞质。Northern 分析验证单链 miRNA 存在于核内(Park 等 2005), 但目前

还不能肯定的是, HST 转运的是 miRNA/miRNA* 复合物还是已经被 DCL1 切割好的单链 miRNA。

miRNA 介导的沉默复合物一般称之为 RISC (RNA induced silencing complex)。目前尚不清楚细胞质中的 RISC 是在转运前还是转运后形成的。在形成 RISC 之前 miRNA 还和 miRNA* 形成配对复合物, 但克隆和表达分析的结果表明, 此时的 miRNA 含量大大高于 miRNA*, 这种不对称的累积表明 miRNA 优先选择进入沉默复合物且不被降解, 而 miRNA* 则受到排除并降解(Reinhart 等 2002)。和动物的 miRNA 一样, 大部分植物 miRNA 的 5' 末端都比 miRNA* 的 5' 末端稳定性差 (Schwarz 等 2003)。在 *AGO* 基因家族的 *AGO1* 参与下, 沉默复合物将成熟的 miRNA 与靶基因配对并对靶基因进行切割或抑制翻译。一般认为 *AGO1* 介导的切割发生在细胞质中, 但也有证据发现它在核内起作用(Xie 等 2003)。拟南芥的 *AGO* 基因家族有 10 个成员, 它们的部分功能已经清楚。*AGO1* 是拟南芥中唯一的一个知道 miRNA 功能必需的 *AGO* 家族的基因(Qi 等 2005)。*AGO4* 的靶基因为转座子和反向重复序列, 并能引起基因的甲基化(Zilberman 等 2004), *AGO7* 和 *AGO10* 与特定的发育有关(Hunter 等 2003)。另外, *AGO7* 还与一些 ta-siRNA 的功能有关(Vazquez 等 2004)。

关于 miRNA 和 siRNA 的关系长期以来一直存在着疑惑。Bartel (2004) 认为两者的主要区别在于它们的生物起源, 而在作用功能上并无实质性的区别。由于 miRNA 和自身的前体 RNA 序列是相同而不是互补的, miRNA 总是通过和 mRNA 的互补, 而不是调控产生自身的基因来行使功能; 但是 siRNA 既可以像 miRNA 一样作用于互补序列, 也可以对自身起源的 RNA 进行作用。siRNA 同时在转录水平(TGS)和转录后水平(PTGS)上行使功能(Baulcombe 2004), 而 miRNA 则多数是在 PTGS 上起作用, 但也有人曾经观察到植物 miRNA 有甲基化作用(Bao 等 2004), 这说明植物中的 miRNA 也有在转录水平上的调控功能。

2 植物 miRNA 基因的寻找

Lagos-Quintana 等(2001)设计出一种专门定向克隆小片段 RNA 的方法来筛选具有相同特征的小分子: 筛选一定大小的 RNA 分子, 连接到 3' 和

5'的适配子(adapter)上, 逆转录后通过PCR扩增、亚克隆并测序。miRNA前体在基因组上的定位和聚类是通过查询基因组数据库进行的。这个方法有助于判断miRNA是否是mRNA、tRNA、rRNA等分子的降解产物。在果蝇中已克隆了37个新的miRNA基因。由于克隆中的已知miRNA的重复出现和rRNA的干扰, 所以用同样的方法寻找miRNA基因变得越来越困难, 于是人们将目光转向植物的特异性组织和发育阶段。Wang等(2004)在籼稻中找到了20个miRNA, Sunkar等(2005)分别在拟南芥和水稻中克隆了26个和14个新miRNA, 迄今采用以上方法已经在不同种属植物中克隆了大量的新的miRNA基因。

miRNA是由约70 nt的茎环结构构成的, 在进化上相对保守, 因此可用计算机软件来识别。有一种计算程序(MiRscan)可以特异识别2个物种间的同源序列, Lim等(2003)用此技术在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)和新杆状线虫(*Caenorhabditis briggsae*)中寻找同源的发卡结构, 用已知的miRNA预测线虫中的miRNA。Legendre等(2005)用“ERPIN”代替“比对”从基因组中搜索与已知的miRNA相似但尚不清楚的miRNA。除了专门用于寻找miRNA的程序和软件以外, mfold和Srnaloop等也是RNA折叠中常用的软件。Cummins等(2006)建立了一种称为基因表达的miRNA连续分析技术(miRNA serial analysis of gene expression, miRAGE), 这种技术可从细胞中分离出很多小RNA分子, 然后将其逆转录成DNA, 并串联成长链后进行测序。之后用计算机分析DNA序列, 以识别那些带有基因特征的miRNAs(如能形成识别Dicer酶的发夹结构)。采用这种技术人们已在人类细胞中确认了200个已知的miRNA, 并发现133个候选miRNA和112个以前尚未发现的miRNA*结构。相信此项技术将很快普遍用于植物中新miRNA的发掘。

植物中miRNAs的研究主要集中在已经测序的单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥, 还有毛果杨。某些miRNA在植物物种间相当保守, 可在某几种植物中同时发现, 有的却只能在单子叶或双子叶植物甚至只在某个物种中发现, 这说明此种miRNA可在进化过程中生成但并不保守。因

此, 如何对各种保守和非保守的miRNA进行分类, 也是miRNA研究中的一个方向。

尽管越来越多的miRNA采用生化或者是生物信息学方法得到鉴别, 但由于很多miRNA是从单个克隆中鉴别出来的, 其中有很多miRNA具有组织特异性和时序性, 以及非保守性和低丰度性, 或者是受特定条件诱导表达, 所以, 有很多miRNA可能在分离和鉴定过程中被漏掉, 而已经鉴别出来的miRNA只不过是众多miRNA中的沧海一粟, 因此寻找miRNA的工作还须继续进行。

3 植物miRNA的靶基因

虽然已经找到了数千个miRNA, 并知道他们在细胞发育、分化、癌变、代谢和死亡中起作用, 但迄今为止, 真正确认功能的miRNA并不多(Bartel 2004; He和Hannon 2004)。现在已知的靶基因的miRNA多数是通过基因筛选(gene screen)和定向克隆方法发现的(Johnston和Hobert 2003)。由于目标不明确, 效率低, 用传统的方法寻找miRNA的靶基因比较困难, 所以用生物信息学方法预测和寻找, 目的性就更加明确。Lewis等(2003)的“TargetScan”法和Kiriakidou等(2004)的“DIANA-microT”法, 另外还有“RNA hybrid”(Rehmsmeier等2004)、“PicTar”(Krek等2005)、“miRanda”(John等2004)方法都是针对预测哺乳动物miRNA靶基因的方法。Sunkar等(2005)用“PATSCAN”发现了4个水稻的miRNA靶基因, 并利用RNA酶介导的5' RACE(5'末端快速扩增)法将miRNA作用的位点标记在靶基因上, 实验验证了4个miRNA对其靶基因的负调控关系。

上述各种计算和预测miRNA靶基因的工作都有以下特点:(1) miRNA和靶序列的保守性;(2) miRNA:mRNA配对中5'端非常重要, 其他位置允许G:U配对;(3) miRNA和靶基因可能是一对多或者多对一的关系。

由于植物中miRNA和靶序列的匹配关系比动物miRNA更完全, 所以通过植物miRNA预测其靶基因更有效。植物miRNA靶序列识别的第一个例证是在miR171中发现的, 此外miRNA在拟南芥基因组中有4个靶序列, 1个位于蛋白编码基因之间且具有预测的茎环结构, 另3个位于

*SCARECROW-LIKE (SCL)*的反义链上,不具有茎环结构。据此可以推测,基因间位点产生的miRNA可能会介导*SCL* mRNA的降解(Reinhart等2002)。

mRNA表达芯片可用于寻找基因组范围内的miRNA靶基因,尤其是易为生物信息学方法预测所遗漏的靶基因(Lim等2003)。Palatnik等(2003)在植物中超表达miR319, mRNA表达芯片的结果表明,5个编码TCP转录因子的mRNA水平下降。植物miR319通过引导TCP基因mRNA的降解,调控叶片发育。Schwab等(2005)通过超表达多个植物miRNA,并利用基因组范围的表达谱,推导建立了一套实验参数识别靶基因,并印证了植物miRNA引导的靶基因mRNA的降解。他们的实验还证实,以前认为主要是通过抑制翻译而起作用的miR172也能有效地导致mRNA的降解。

4 植物 miRNA 的功能

目前已知的植物miRNA的功能主要表现在调控植物发育的各个方面,其靶基因多数是植物发育模式和细胞分化中相关的转录因子。而这些靶基因调控的植物生长发育过程主要包括激素的信号传导、细胞代谢、器官分化、叶的发育、侧根形成、育性转换、花器官的形成和生殖。而且大部分的miRNA功能都重叠于整个调控网络中(Mallory和Vaucheret 2006)(图1)。

越来越多的研究表明,miRNA在植物的各种生理过程中有潜在功能。特别是植物miRNA与非生物胁迫之间可能存在的密切关系,已开始不断受到人们的关注。Jones-Rhoades和Bartel(2004)分别通过预测和实验证实拟南芥中只有在胁迫条件下才表达的部分新miRNA。从胁迫下的植物中克隆miRNA导致一类新的内源性siRNA和nat-siRNAs的发现(Sunkar等2005),并发现它们在胁迫响应中起作用。植物miR395和miR399分别是

在缺硫和缺磷条件下诱导发现的,而这种诱导对于营养缺失胁迫的一些基因下游调控很重要(Jones-Rhoades和Bartel 2004; Fujii等2005; Chiou等2006)。环境胁迫可以诱导很多基因表达,而这些对逆境胁迫产生的耐性或响应起作用的基因诱导很可能受miRNA负调控。Sunkar等(2006)在拟南芥中的研究结果证实,miR398的2个靶基因,Cu/Zn过氧化物歧化酶基因(*CSD1*和*CSD2*),可氧化体内的过氧化物自由基,从而缓解逆境对植物生长的危害。同时,Sunkar等(2006)的结果显示,*CSD1*和*CSD2*基因的表达受miR398诱导的mRNA降解而导致的精细调控,因此他们认为在转基因植物中通过抑止miR398导致的对*CSD2*基因的负调控可能是改善植物在氧化逆境中生长的一条有效途径,这也为通过小分子RNA的遗传操作改良作物的抗逆性提供了一条新思路。但至今已知与植物逆境胁迫有关的miRNA还不多,有待进一步查明。

迄今在植物中尚未发现miRNA和内源性siRNA对生物胁迫的直接响应,但抑制miRNA或siRNA会对植物病毒起一定作用。Takeda等(2005)在植物抗菌研究中观察到,miRNA通过调控生长素的信号传递增加植物的抗病性。另外,植物中有的miRNA对自身miRNA的生成具有调控作用。miR162的靶基因为*DCL1*,miR168的靶基因为*AGO1*,而*DCL1*和*AGO1*在miRNA的生成中是2个关键的调控因子(Vazquez等2004; Xie等2003)。*AGO2*也可受miR403调节,但两者之间的关系尚不清楚(Allen等2005)。

在植物miRNA的功能验证中,常用35S强启动子超表达或microRNA基因缺失的方法。miRNA的超表达常导致多种发育缺失,因为大部分的miRNA调控多个靶基因,这些基因常常都是与发育有关的转录因子(Mallory和Vaucheret 2006)。有时超表达miRNA也会造成致死突变(Kim等

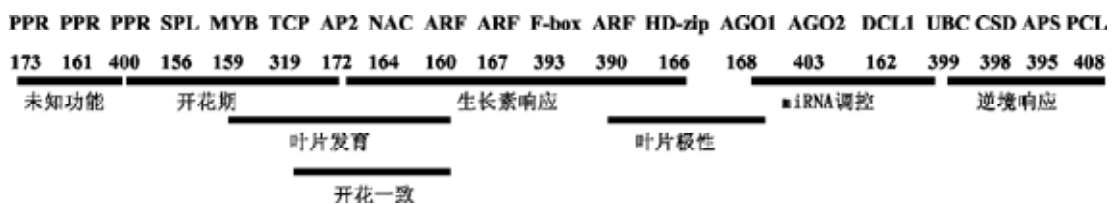


图1 植物miRNA调控的重叠网络
根据Mallory和Vaucheret(2006)改绘。

2005)。而 miRNA 基因或者 miRNA 靶基因的突变又常常造成特异的发育缺失。抗 miRNA 的靶基因转化研究也是揭示植物 miRNA 调控网络的强有力工具。

miRNA 芯片是新近开发的快速、有效、高通量研究 miRNA 表达的方法。Liu 等(2004)首次用于检测 miRNA 在肿瘤细胞中的表达,而 Nelson 等(2004)提出的一种 RAKE (RNA-primed, array-based Klenow enzyme assay)方法能够在特定的细胞和肿瘤中同时检测出所有 miRNA 的表达。Axtell 和 Bartel (2005)首先将 miRNA 芯片运用于植物 miRNA 的表达研究。原位杂交技术检测 miRNA 的表达更直观,是了解 miRNA 原位时空表达的好方法(Chen 2004)。

5 结语

miRNA 是一类广泛存在的具有多种调控作用的非编码单链 RNA 分子,在动物、植物和微生物各种生物体基因组中的 miRNA 基因在数量上约占 1%。miRNA 主要通过 2 种机制,即翻译抑制和转录切割来降低其靶基因编码的蛋白水平,进而在生长、发育、增殖、分化和死亡各个过程中起调控作用。翻译抑制主要存在于动物之中,miRNA 与靶基因的 3' 非编码区结构域结合;而在植物中,miRNA 常常与靶基因的编码序列结合,而且一般都是完全互补或者很少不配对,因而导致 mRNA 的切割降解,从而进一步调控植物的生长发育或其他生理过程。

虽然在各个物种中发现的 miRNA 数量不少,但是能给出直接证据证明 miRNA 的靶基因及其功能的 miRNA 仍然较少。迄今已经克隆或预测到的植物 miRNA 数量在不断增加,但用实验证据获得这些 miRNA 的靶基因,并揭示它们的功能,相对于动物 miRNA 而言其研究进展相对滞后,可以说是后基因组时代需要解决的问题之一。在环境胁迫下,植物 miRNA 可能参与的逆境响应与抗逆调控的研究则更是刚刚开始。miRNA 具有时序表达特异和组织特异的特点,如何研究清楚 miRNA 和它们的靶基因,并揭示他们的功能,更精确地掌握 miRNA 在植物生长发育,特别是抗逆等生理过程中的调控机制,是目前 miRNA 研究领域的重要内容。在转录分析、miRNA 超表达、抗 miRNA

靶基因遗传转化的基础上,结合高通量的芯片分析手段和生物信息学的方法,将会对植物 miRNA 的表达特征及其靶基因与功能的研究起促进作用。

参考文献

- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005). microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121: 207~221
- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell*, 15: 2730~2741
- Axtell MJ, Bartel DP (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell*, 17: 1658~1673
- Bao N, Lye KW, Barton MK (2004). MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*, 7: 653~662
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281~297
- Baskerville S, Bartel DP (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11: 241~247
- Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356~363
- Chen X (2004). microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303: 2022~2025
- Chiou T-J, Aung K, Lin S-I, Wu C-C, Chiang S-F, Su C-L (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 412~421
- Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E et al (2006). The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3687~3692
- Fujii H, Chiou T-J, Lin S-I, Aung K, Zhu JK (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 15: 2038~2043
- He L, Hannon GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5 (7): 522~531
- Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and *HYL1/DRB*-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 57: 173~188
- Hunter C, Sun H, Poethig RS (2003). The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an *ARGONAUTE* family member. *Curr Biol*, 13: 1734~1739
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 2 (11): e363
- Johnston RJ, Hobert O (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 426: 845~849
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant miRNAs and their targets, including a stress-

- induced miRNA. *Mol Cell*, 14: 787~799
- Kim J, Jung J-H, Reyes JL, Kim Y-S, Kim S-Y, Chung K-S, Kim JA, Lee M, Lee Y, Kim VN et al (2005). microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J*, 42: 84~94
- Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A (2004). A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, 18 (10): 1165~1178
- Krek A, Gruen D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M et al (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37: 495~500
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 12753~12758
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853~858
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843~854
- Legendre M, Lambert A, Gautheret D (2005). Profile-based detection of microRNA precursors in animal genomes. *Bioinformatics*, 21 (7): 841~845
- Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115: 787~798
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel D (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 17: 991~1008
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M et al (2004). An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (26): 9740~9744
- Mallory AC, Vaucheret H (2006). Function of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet*, 38: S31~S36
- Nelson PT, Baldwin DA, Scarce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z (2004). Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods*, 1: 155~161
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425: 257~263
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 3691~3696
- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ (2005). Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol Cell*, 19: 421~428
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10 (10): 1507~1517
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901~906
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 16: 1616~1626
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110: 513~520
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*, 8: 517~527
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115: 199~208
- Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu J (2005). Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 17: 1397~1411
- Sunkar R, Girke T, Zhu J-K (2005). Identification and characterization of endogenous small interfering RNAs from rice. *Nucleic Acids Res*, 33: 4443~4454
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu J-K (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18: 2051~2065
- Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J*, 24: 3147~3157
- Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP (2004). The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*, 18: 1187~1197
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Cr  t   P (2004). Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell*, 16: 69~79
- Wang JF, Zhou H, Chen YQ, Luo QJ, Qu LH (2004). Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res*, 32 (5): 1688~1695
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol*, 138: 2145~2154
- Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003). Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*, 13: 784~789
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307: 932~935
- Zilberman D, Cao X, Johansen LK, Xie Z, Carrington JC, Jacobsen SE (2004). Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, 14: 1214~1220