

miRNA在植物重金属胁迫应答中的作用

张林, 丁艳菲*, 王熠, 朱诚*

中国计量学院生命科学院, 杭州310018

摘要: microRNA (miRNA)是一种新型的长度为20~24 nt的非编码RNA, 通过对靶基因的表达调节进而参与调控植物体的多种生理代谢活动。重金属是一类重要的环境污染物, 严重危害植物的生长发育, 甚至导致植物死亡。植物在长期的进化过程中形成了抵御重金属胁迫的多种机制, 如miRNA对特定基因转录后水平的调控就在逆境胁迫应答中发挥重要作用。本文综述了植物中参与重金属胁迫应答miRNA的种类及作用机制, 为揭示重金属胁迫条件下基因表达调控机制, 以及利用基因工程手段改良植物对重金属的耐受性提供了线索和依据。

关键词: miRNA; 重金属胁迫; 调节机制; 植物

Role of miRNA in Plant Heavy Metal Stress Response

ZHANG Lin, DING Yan-Fei*, WANG Yi, ZHU Cheng*

College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

Abstract: microRNAs (miRNAs), a newly discovered class of 20–24 nt non-protein-coding small RNAs, have been reported to involve a broad range of metabolic and physiological processes in plants through the regulation of target gene expression. Heavy metals are an important class of environmental contaminants, seriously threatening the growth and development of plants and even causing plant death. In the long time of evolutionary process, plants have formed various mechanisms of heavy metal stress resistance, in which the miRNA-guided post-transcriptional gene regulation plays an important role in environmental stress response. This article reviews recent progress in research on the miRNAs involved in heavy metal stress response and the regulatory mechanisms, which will help to reveal gene regulation mechanisms under heavy metal stress as well as provide evidence for the genetic improvement in plant heavy metal tolerance.

Key words: miRNA; heavy metal stress; regulatory mechanisms; plants

近年来随着工业“三废”的排放以及化肥农药的大量施用, 我国重金属污染形势日益严重。环境污染方面所说的重金属, 主要是指Cd、Hg、Pb、Cr以及类金属As等生物毒性显著的非必需重金属, 也指具有一定毒性的必需重金属如Cu、Fe和Ni等。非必需重金属元素和过量的必需重金属元素对植物都是有害的(Valle和Ulmer 1972)。重金属不仅严重影响植物的生长发育, 造成产量和品质下降, 还可以通过食物链进入人体, 影响人类健康(Verbruggen等2009)。植物在长期的进化过程中产生了对重金属胁迫的多种抗性, 如: 植物对重金属的螯合作用、根系富集、细胞壁束缚、跨膜转运以及抗氧化响应等(Clemens等2001; Xu等2012)。这些重金属应答过程中的很多基因如重金属转运体基因得到了克隆与功能解析(Ueno等2010; 陈英旭2008), 但是这些应答重金属胁迫的基因的表达调控机制如何? 其中关键的调控因子是

什么? 这些并不清楚, 亟待研究。

microRNA (miRNA)是一类具有20~24个核苷酸(nt)、新型的调控基因表达的非编码单链RNA分子, 广泛存在于植物、线虫和人类等真核生物细胞中(Jones-Rhoades和Bartel 2004; Jones-Rhoades等2006; Liu等2008)。随着越来越多miRNA的发现和功能研究, 它在动物、植物以及细菌的细胞生长发育、形态建成、信号转导、胁迫响应等代谢过程中的调控作用开始受到关注。miRNA通过介导靶基因mRNA的降解和翻译抑制机制, 主要在转录后水平负调控靶基因的表达(Lee等1993; Chen

收稿 2014-03-25 修定 2014-04-22

资助 浙江省自然科学基金项目(LY13C020002)、浙江省大学生科技创新项目、国家自然科学基金项目(31170251)和浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)。

* 共同通讯作者(E-mail: dingyanfei@cjlu.edu.cn, Tel: 0571-87676371; E-mail: pzhch@cjlu.edu.cn, Tel: 0571-86914510)。

2004)。近年来研究表明miRNA在植物对重金属胁迫的响应过程中发挥重要作用: 在重金属胁迫下, 植物miRNA表达量发生显著上调或下调, 以响应重金属胁迫(Yang和Chen 2013; Ding和Zhu 2009; Mendoza-Soto等2012)。本文总结近年来国内外研究发现的参与植物重金属应答的miRNA, 并对miRNA的具体作用机制和调节网络进行探讨和展望。

1 参与重金属胁迫应答的miRNA

尽管Cu和Fe等重金属是生命活动所需要的微量元素, 但是大部分重金属如Cd、Hg和Pb等没有生物功能, 却可通过必需重金属的转运系统进入细胞, 影响细胞的正常生命功能。它们的毒害较大, 抗性相关的miRNA研究也较多。近年来, 人们采用表达序列标签(Xie等2007)、构建miRNA文库(Sunkar和Zhu 2004; Huang等2009)、RT-PCR (Xie等2007)、定量PCR (Ding等2011)、miRNA基因芯

片(Fang等2013; Ding等2011)以及miRNA高通量测序(Zhou等2012a, b)等方法, 发现miRNA可受多种重金属逆境胁迫诱导产生, 并在植物抗重金属胁迫中发挥着重要的作用。表1和图1列举了近年来发现的重金属相关miRNA的种类及它们参与重金属响应的具体作用途径。

Xie等(2007)用表达序列标签(EST)及生物信息学方法预测了甘蓝型油菜(*Brassica napus*)中的21个miRNA, 并且采用RT-PCR方法实验证实了其中5个miRNA, 发现miR156、miR171、miR393和miR396a的转录受重金属Cd的抑制, 暗示这几个miRNA在重金属Cd胁迫响应中发挥作用。Zhao等(2008)在豆科的模式生物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中, 应用实时定量PCR方法发现了部分miRNA的表达可受重金属Cd、Hg和Al的诱导与调节。其中, miR171、miR319、miR393和miR529在Cd、Hg和Al胁迫下表达上调, 而miR166、

表1 参与重金属胁迫响应miRNA的种类及具体作用途径

Table 1 The type of miRNAs involved in heavy metal stress response and their specific pathway

miRNA	靶基因	具体途径	所调控的重金属
miR156	GGT	重金属转运	Al、As、Cd、Hg
miR159	ABC	重金属转运	Al、As、Cd、Hg
miR160	ARF10/16/17	植物激素信号调节	Al、Cd、Hg
miR164	GRXS12	抗氧化作用	As、Cd、Hg、Mn
miR166	HD-Zip	根发育	Al、As、Cd、Hg、Mn
miR167	Nramp	重金属转运	Al、As、Cd
miR168	Argonaute	植物激素信号调节	Cd、As
miR171	CSD	抗氧化作用	Al、As、Cd、Hg
miR390	RLK	侧根发育	Al、As、Cd、Hg、Mn
miR393	TIR1	植物激素信号调节	Al、As、Cd、Hg
miR395	APS、SULTR2;1	重金属转运	Al、Cd、Hg、Mn
miR398	CSD	抗氧化作用	Al、As、Cd、Hg、Cu
miR528	DCL1	重金属转运	As、Cd、Mn

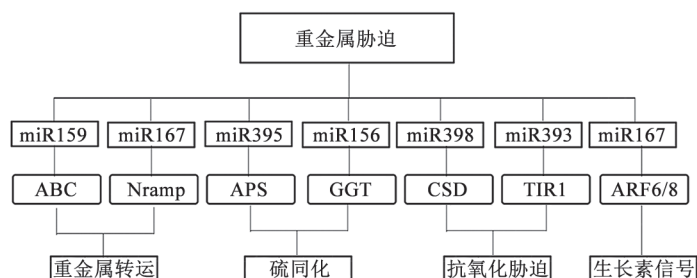


图1 典型的miRNA在植物重金属胁迫响应中的作用途径

Fig.1 Functional pathway of miRNAs in the plant response to heavy metal stress

miR398则表达下调。Huang等(2009)采用miRNA直接克隆法构建Cd处理水稻(*Oryza sativa*)幼苗的miRNA文库,测序分析发现了Cd胁迫应答相关的水稻miRNA数据库(miRBase)中9个miRNA,并克隆了19个新的miRNA。这些新发现的水稻miRNA与拟南芥等其他物种不具进化同源性,说明是水稻特异的miRNA。对这些新发现的miRNA进行靶基因预测,发现它们靶向代谢相关的酶类、信号转导因子和转录因子等。其中miR604靶向脂类转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)基因, LTP参与植物多种抗逆性反应并介导植物激素信号转导等过程(Jung等2006),暗示miR604通过对LTP的表达调节参与水稻对Cd胁迫的响应(Huang等2009)。

上述几种重金属胁迫相关的miRNA基本采用直接克隆法和RT-PCR方法进行克隆鉴定。但这种方法检测的范围小,灵敏度低,对一些表达量低或者组织与发育时期特异性表达的miRNA难以分离得到。miRNA芯片和高通量测序法可以高通量、高特异、高灵敏地检测miRNA的表达,近年来利用这两种技术进行重金属相关miRNA克隆和表达的报道日渐增多。Fang等(2013)采用miRNA微阵列芯片鉴定了经Cd处理和未处理的HX3(Cd耐受型)和ZH24(Cd敏感型)大豆(*Glycine max*)株系中miRNA表达模式的差异。共鉴定出26个与Cd应激相关的miRNA,其中有9个miRNA在2个株系中均有发现,有5个和12个miRNA分别在HX3和ZH24中特异表达。Szittyá等(2008)采用高通量测序技术鉴定Hg处理蒺藜苜蓿植株和对照植株中的miRNA,发现了25个保守miRNA家族和26个新的miRNA参与到重金属胁迫应答中。Aloui等(2009)以Solexa高通量测序技术在研究蒺藜苜蓿对Hg毒害的响应机制时发现了52个新的miRNA。

2 miRNA参与重金属胁迫应答的具体途径

2.1 重金属转运

研究报道表明ABC型转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC)、重金属ATP酶(heavy metal ATPase, HMA)蛋白家族、巨噬细胞蛋白家族(natural associated macrophage protein, Nramp)、助阳离子扩散蛋白家族(cation diffusion facilitator, CDF)以及锌铁转运蛋白家族(zinc iron transporters protein, ZIP)是参与重金属离子转运的重要蛋白(施积炎等2004;

Mills等2003)。其中ABC型转运蛋白为一类定位在细胞膜上的跨膜转运器,负责将Cd螯合物如GS-Cd复合体转运排出细胞并与根系分泌的多糖等黏胶状物质结合滞留在根外,以起到降低Cd毒害的作用(陈英旭2008; Bovet等2003)。Zhou等(2012a)用高通量测序法发现在镉胁迫下油菜植株中miR159表达下调, miR159的靶基因ABC转运体表达提高,促进Cd螯合物转运到植物根部土壤中,从而应答重金属Cd胁迫。Chen等(2011)用高通量测序法发现蒺藜苜蓿在Al胁迫下, miR159表达也下调。除此之外, miR159还参与到重金属Hg的响应调节中,其调节原理与Cd的调节原理类似,同样是miR159下调,促进将Hg转运至胞外(Zhou等2012b)。

Nramp蛋白家族是一类高度保守的膜蛋白,广泛参与到植物、动物、细菌和真菌等体内的重金属离子运输过程。其中, *AtNramp3*主要在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的根维管束、茎和叶中表达, *AtNramp3*过量表达的转基因拟南芥植株对Cd的积累和敏感性大大增强(Mäser等2001; Thomine等2003)。在镉胁迫下,甘蓝型油菜miR167表达上升, miR167进而通过调控其靶基因*GT073274*(即重金属转运蛋白基因*Nramp1*)的含量参与植株中镉离子的转运(Zhou等2012a)。另外,水稻在As胁迫下miR167表达量显著下调(Liu和Zhang 2012),在Al胁迫下表达量则上升(Chen等2011)。

2.2 硫同化

miR395是一种广泛存在于拟南芥、水稻、甘蓝型油菜等植物中的保守miRNA (Jones-Rhoades和Bartel 2004)。最近研究表明, miR395通过参与调控硫饥饿诱导的低亲和力硫酸盐转运体 (*SULTR2;1*)和3个ATP硫酸化酶基因(ATP sulphurylase, *APS*) (*APS1*、*APS3*和*APS4*),参与重金属Al、Cd和Hg胁迫应答(Yang和Chen 2013; Zhang等2013)。张芸等(2010)研究证实,拟南芥中miR395与硫同化途径中的关键酶ATP硫酸化酶(*APS1*、*APS3*、*APS4*) mRNA存在互补序列。Northern杂交分析显示,缺硫拟南芥植株中的miR395被诱导表达,而*APS1*的积累量明显减少,证明拟南芥miR395在缺硫条件下参与对其靶基因*APS1*的表达负调控。此外,5' RACE证实拟南芥中的一个低亲和硫转运体基

因(ATP sulfate transporter, *AST*) *AST68* mRNA也是miR395的一个靶基因,说明miR395在植物硫同化和转运途径中起到了重要的调节作用(Huang等2010)。硫同化与植物响应Cd胁迫有密切关系,如植物在Cd胁迫下通过增强对硫酸盐的吸收和还原,迅速合成半胱氨酸和谷胱甘肽(glutathione, GSH)等代谢物以结合重金属(Sanita和Gabbrielli 1999; 孙雪梅和杨志敏2006)。甘蓝型油菜中,miR395通过对其靶基因*APS*和*SULTR2*的表达调控,参与到Cd胁迫调节(Zhang等2013)。miR395过表达转基因甘蓝型油菜的地上部中GSH等非蛋白巯基含量显著增加,表明miR395分别通过靶向基因的*APS*和*SULTR2;1*参与硫酸盐的分配调节。并且,相比野生型植株,miR395过表达的油菜植株通过硫酸盐的分配调节,增加了Cd的积累量并表现出更高的Cd耐性(Zhang等2013)。

miR156通过调控靶基因谷胱甘肽 γ -谷氨酰转肽酶(glutathione- γ -glutamylcysteinyl transferase, *GGT*)含量,进而参与重金属应答(Zhou等2012b)。*GGT*与植物螯合肽合酶(phytochelatinase, *PCS*)共同参与调节植物螯合肽(PC)和三肽谷胱甘肽(tripeptide glutathione, C-GLU-CYS-GLY)的合成,通过PC、三肽谷胱甘肽与Cd、Hg等重金属螯合形成PC-重金属复合物,进而在重金属的贮藏和转运中起到重要作用(Cobbett 2000)。拟南芥或甘蓝型油菜在Cd胁迫下miR156表达下调,蒺藜苜蓿在Hg胁迫下miR156表达下调,而蒺藜苜蓿在Al胁迫下miR156表达上调,水稻在As胁迫下miR156表达上调,以上植物中miR156通过介导转肽酶基因的表达参与对多种有毒重金属的耐受(Chen等2011; Liu和Zhang 2012; Zhou等2008, 2012b)。

2.3 抗氧化胁迫

重金属胁迫下,植物细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)[超氧化物阴离子(O_2^-)和羟自由基($OH\cdot$),以及过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧(1O_2)等]快速大量积累,并进一步毒害植物细胞(Mittler 2002)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, *SOD*)可将ROS转变成过氧化物和分子氧,构成了植物体中抵御高毒性超氧化物的第一道防线(Mittler 2002; Fridovich 1995)。研究表明miR398通过靶向2种SOD,即Cu, Zn超氧化物歧化酶(Cu,

Zn superoxide dismutase, *CSD*)中的*CSD1*和*CSD2*,在Al、Cd、Hg和Cu等重金属的胁迫响应中发挥重要作用(丁艳菲等2010; Yang和Chen 2013)。Sunkar等(2006)通过Northern杂交发现,拟南芥幼苗在重金属Cu和Fe胁迫下,miR398表达被诱导下调,这种下调促进*CSD1*和*CSD2* mRNA的积累与氧化胁迫耐性的提高。并且过量表达具有miR398抗性的*CSD2*转基因拟南芥中,相比仅是*CSD2*过表达拟南芥植株,积累了更多的*CSD2* mRNA,表现出更高的重金属胁迫耐性(Sunkar等2006)。Zhou等(2008)通过高通量测序技术发现蒺藜苜蓿在Al胁迫下miR398也表达下调,并通过*CSD*含量的提高以抵御Al造成的氧化胁迫。

2.4 生长素信号转导

重金属严重毒害植物体的生长发育,表现为植株矮化,根、茎生长迟缓,叶片失绿、卷曲等(Rodríguez-Serrano等2009; Sandalio等2001)。另一方面,植物通过对根系等器官形态结构的调整,影响植物对重金属的吸收、螯合和转运,以起到抵御重金属毒害的作用,提高对环境胁迫的应答以及营养元素、水分的吸收利用,对植物的生长有重要意义(Malamy 2005)。miRNA的功能研究最初集中在植物生长发育方面,重金属胁迫下很多与生长发育相关的miRNA表达发生变化。这些miRNA对植物的生长发育及重金属等逆境应答的双重调节,它们之间可能相互影响,共同调节(Zhou等2012b; Liu和Zhang 2012; Ding等2011)。Kong和Yang (2010)发现水稻体内miR167通过调控生长素应答因子基因(auxin response factor, *ARF*)参与到Fe的调控中。*ARF8*下游进一步调控*ARF6*,共同控制生长素(auxin, *AUX*)信号和调节侧根发育(Zhou等2012b)。*TIR1*是生长素受体与吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, *IAA*)蛋白辅助交互,从而导致*AUX/IAA*的泛素化和随后的降解(Dharmasiri和Estells 2002)。miR393目标产物为主要为*TIR1*,通过调控生长素信号来响应重金属胁迫。蒺藜苜蓿中miR393表达下调控制植物对Al的毒害作用(Chen等2011)。甘蓝型油菜和水稻在Cd胁迫下,miR393表达上调,其靶基因*TIR1* mRNA水平下调,一方面导致生长素信号下调;另一方面可能导致E3泛素连接酶靶蛋白含量减少,以增加植物对Cd的耐受

性(Jones-Rhoades和Bartel 2004; Zhou等2012a; Xie等2007)。除此之外, miR393还参与到蒺藜苜蓿对Hg、As胁迫的调节中,在Hg或As胁迫下miR393均表达上调(Zhou等2012b; Xie等2007)。

3 研究展望

miRNA的发现是生命科学研究领域的重大突破,同时也提供给人们一个认识基因和基因表达调控本质的强有力工具。miRNA处于基因表达调控的中心位置,在植物对重金属胁迫的应答过程中起着重要作用。近年来随着Solexa测序、微阵列芯片等高通量测序技术的应用,越来越多的重金属相关植物miRNA得到克隆与鉴定,相比之下对它们的生物学功能却知之甚少。这些miRNA究竟如何发挥作用的?其具体功能与作用机制是什么?miRNA对其靶基因的调控很复杂,是否还存在其他的靶基因?这些靶基因究竟如何发挥作用?参与的生物过程与信号通路是什么?这些问题仍未得到解答。植物miRNA在重金属胁迫应答中的具体生物学功能尚需深入研究。

目前所发现的微小RNA尚且很少,除了miRNA之外,还有siRNA、snmRNA、snRNA、snoRNA等一系列非编码RNA,它们也有着不同种类和功能,相信这些不同小分子RNA的研究对于人们解决环境重金属污染等问题将起到极大的助力。

参考文献

- 陈英旭(2008). 土壤重金属的植物污染化学. 北京: 科学出版社
- 丁艳菲, 王光钺, 傅亚萍, 朱诚(2010). miR398在植物逆境胁迫应答中的作用. 遗传, 32 (2): 129~134
- 施积炎, 陈英旭, 田光明, 林琦(2004). 海州香薷和鸭跖草铜吸收机理. 植物营养与肥料学报, 10 (6): 642~646
- 孙雪梅, 杨志敏(2006). 植物的硫同化及其相关酶活性在镉胁迫下的调节. 植物生理与分子生物学学报, 32 (1): 9~16
- 张芸, 李会, 车丽玲, 黄思齐, 邱承祥, 杨志敏(2010). 拟南芥miR395d基因的克隆和过表达载体构建及其在油菜中的转化. 南京农业大学学报, 33 (2): 25~29
- Aloui A, Recorbet G, Gollotte A, Robert F, Valot B, Gianinazzi-Pearson V, Aschi-Smiti S, Dumas-Gaudot E (2009). On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics*, 9 (2): 420~433
- Bovet L, Eggmann T, Meyland-Bettex M, Polier J, Kammer P, Marin E, Feller U, Martinoia E (2003). Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatments, induction of *AtMRP3*. *Plant Cell Environ*, 26: 371~381
- Chen L, Wang T, Zhao M, Tian Q, Zhang WH (2011). Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235 (2): 375~386
- Chen X (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303: 2022~2025
- Clemens S (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475~486
- Cobbett CS (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 3 (3): 211~216
- Dharmasiri S, Estelle M (2002). The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol*, 49 (3-4): 401~408
- Ding YF, Zhu C (2009). The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 386 (1): 6~10
- Ding YF, Chen Z, Zhu C (2011). Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot*, 62 (10): 3563~3573
- Fang X, Zhao Y, Ma Q, Huang Y, Wang P, Zhang J, Nian H, Yang CY (2013). Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. *PLoS One*, 8 (12): e81471
- Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64: 97~112
- Huang SQ, Xiang AL, Che LL, Chen S, Li H, Song JB, Yang ZM (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotech J*, 8 (8): 887~899
- Huang SQ, Peng J, Qiu CX, Yang ZM (2009). Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *J Inorg Biochem*, 103 (2): 282~287
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14 (6): 787~799
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 19~53
- Jung HW, Lim CW, Hwang BK (2006). Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (CALTPIII) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Sci*, 170: 258~266
- Kong WW, Yang ZM (2010). Identification of iron-deficiency responsive microRNA genes and *cis*-elements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 48 (2): 153~159
- Lee R, Feinbaum R, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNA with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843~854
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, 14 (5): 836~843
- Liu Q, Zhang H (2012). Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *J Agr Food Chem*, 60 (26): 6524~6536
- Malamy JE (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ*, 28 (1):

- 67~77
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D et al (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126 (4): 1646~1667
- Mendoza-Soto AB, Sánchez F, Hernández G (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Front Plant Sci*, 3: 105
- Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, Hall JL, Williams LE (2003). Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J*, 35 (2): 164~176
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405~410
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, del Río LA, Sandalio LM (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol*, 150 (1): 229~243
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, Del Río LA (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot*, 52 (364): 2115~2126
- Sanita di Toppi L, Gabbriellini R (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41 (2): 105~130
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (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 (8): 2051~2065
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2001~2019
- Szittyá G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Fevèreiro MP, Moulton V, Dalmay T (2008). High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics*, 9: 593
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier - Brygoo H (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J*, 34 (5): 685~695
- Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang CF, Ando T, Yano M, Ma JF (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (38): 16500~16505
- Valle BL, Ulmer DD (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu Rev Biochem*, 41: 91~128
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12 (3): 364~372
- Xie FL, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, Yang ZM (2007). Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Lett*, 581 (7): 1464~1474
- Xu J, Zhu Y, Ge Q, Li Y, Sun J, Zhang Y, Liu X (2012). Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. *New Phytol*, 196 (1): 125~138
- Yang ZM, Chen J (2013). A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5 (9): 1184~1190
- Zhang LW, Song JB, Shu XX, Zhang Y, Yang ZM (2013). miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus*. *J Hazard Mat*, 250: 204~211
- Zhou ZS, Huang SQ, Yang ZM (2008). Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochem Biophys Res Commun*, 374: 538~542
- Zhou ZS, Song JB, Yang ZM (2012a). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *J Exp Bot*, 63 (12): 4597~4613
- Zhou ZS, Zeng HQ, Liu ZP, Yang ZM (2012b). Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant Cell Environ*, 35 (1): 86~99